

(19)

Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 1 001 027 A2

A18

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
17.05.2000 Patentblatt 2000/20

(51) Int. Cl.⁷: C12N 15/53, C12N 15/67,
C12N 15/70, C12N 1/21,
C12P 13/02, C12P 7/42

(21) Anmeldenummer: 99118670.1

(22) Anmeldetag: 22.09.1999

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE

Benannte Erstreckungsstaaten:

AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: 09.10.1998 DE 19846499

(71) Anmelder:

Degussa-Hüls Aktiengesellschaft
60311 Frankfurt am Main (DE)

(72) Erfinder:

• Elischewski, Frank, Dr.
33818 Leopoldshöhe (DE)

- Kallnowski, Jörm, Dr.
33615 Bielefeld (DE)
- Pühler, Alfred, Prof. Dr.
33739 Bielefeld (DE)
- Dusch, Nikole, Dr.
33619 Bielefeld (DE)
- Dohmen, Jürgen, Dr.
40760 Meerbusch (DE)
- Farwick, Mike, Dr.
33615 Bielefeld (DE)
- Thierbach, Georg, Dr.
33613 Bielefeld (DE)

(54) **Verfahren zur Herstellung von Pantothenäsäure durch Verstärkung von für Ketopantoat-Reduktase kodierende Nukleotidsequenzen**

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung und Verbesserung D-Pantothenäsäure produzierender Mikroorganismen durch Verstärken für die Ketopantoatreduktase codierender Nucleotidsequenzen, insbesondere des panE-Gens, einzeln oder kombiniert miteinander, und gegebenenfalls zusätzlich des ilvC-Gens, die diese Nucleotidsequenzen enthaltende Mikroorganismen und ein Verfahren zur Herstellung D-Pantothenäsäure bestehend aus der Fermentation dieser Mikroorganismen, der Anreicherung der Pantothenäsäure im Medium oder in den Zellen der Mikroorganismen und dem Isolieren der D-Pantothenäsäure.

EP 1 001 027 A2

Beschreibung**Stand der Technik**

5 [0001] Die Pantothenäure stellt ein kommerziell bedeutendes Vitamin dar, das in der Kosmetik, der Medizin, der Humanernährung und in der Tierernährung Anwendung findet.

[0002] Pantothenäure kann durch chemische Synthese oder biotechnisch durch Fermentation geeigneter Mikroorganismen in geeigneten Nährösungen hergestellt werden. Bei der chemischen Synthese ist das DL-Pantolacton eine wichtige Verbindung. Es wird in einem mehrstufigen Verfahren aus Formaldehyd, Isobutyraldehyd und Cyanid hergestellt. In weiteren Verfahrensschritten wird das racemische Gemisch aufgetrennt und D-Pantolacton mit β -Alanin kondensiert, und man erhält D-Pantothenäure.

10 [0003] Der Vorteil der fermentativen Herstellung durch Mikroorganismen liegt in der direkten Bildung der gewünschten stereoisomeren D-Form.

[0004] Verschiedene Arten von Bakterien, wie z. B. *Escherichia coli*, *Arthrobacter ureafaciens*, *Corynebacterium erythrogenes*, *Brevibacterium ammoniagenes* und auch Hefen, wie z. B. *Debaromyces castellii* können wie in EPA 0 493 060 gezeigt, in einer Nährösung, die Glucose, DL-Pantoinsäure und β -Alanin enthält, D-Pantothenäure produzieren. EPA 0 493 060 zeigt weiterhin, daß bei *Escherichia coli* durch Amplifikation von Pantothenäure-Biosynthesegene, die auf den Plasmiden pFV3 und pFV5 enthalten sind, in einer Nährösung, die Glucose, DL-Pantoinsäure und β -Alanin enthält, die Bildung von D-Pantothenäure verbessert wird.

15 [0005] EPA 0 590 857 und US-Patent 5,518,906 beschreiben von *Escherichia coli* Stamm IFO3547 abgeleitete Mutanten wie FV5714, FV525, FV814, FV521, FV221, FV6051 und FV5069 die Resistenzen gegen verschiedene Antimetabolite wie Salizylsäure, α -Ketobuttersäure, β -Hydroxyasparaginsäure, O-Methylthreonin und α -Ketoisovaleriansäure tragen und in einer Nährösung, die Glucose enthält Pantoinsäure und in einer Nährösung, die Glucose und β -Alanin enthält, D-Pantothenäure produzieren. In EPA 0 590 857 und US-Patent 5,518,906 wird weiterhin gezeigt, daß nach Amplifikation der Pantothenäure-Biosynthesegene, die auf dem Plasmid pFV31 enthalten sind, in den oben genannten Stämmen in einer Nährösung die Glucose enthält die Produktion von D-Pantoinsäure und in einer Nährösung die Glucose und β -Alanin enthält die Produktion von D-Pantothenäure verbessert wird.

20 [0006] In WO 97/10340 wird darüber hinaus gezeigt, daß in Pantothenäure bildenden Stämmen von *Escherichia coli* durch Erhöhung der Aktivität des Enzyms Acetohydroxysäure-Synthase II, einem Enzym der Valin Biosynthese, die Pantothenäure-Produktion weiter gesteigert werden kann.

25

Aufgabe der Erfindung

30 [0007] Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Grundlagen für ein verbessertes Verfahren zur Herstellung von Pantothenäure bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

35 [0008] Das Vitamin Pantothenäure stellt ein kommerziell bedeutendes Produkt dar, das in der Kosmetik, der Medizin, der Humanernährung und in der Tierernährung Anwendung findet. Es besteht daher ein allgemeines Interesse daran verbesserte Verfahren zur Herstellung von Pantothenäure bereitzustellen. Wenn im folgenden Text D-Pantothenäure oder Pantothenäure oder Pantothensäure erwähnt werden, sind damit nicht nur die freie Säure sondern auch die Salze der D-Pantothenäure wie z.B. das Calcium-, Natrium-, Ammonium- oder Kaliumsalz gemeint.

40 Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung und Verbesserung Pantothenäure produzierender Mikroorganismen durch Verstärkung, insbesondere Überexpression von für die Ketopantaoatreduktase kodierenden Nukleotidsequenzen, insbesondere des panE-Gens, einzeln oder kombiniert miteinander, und gegebenenfalls zusätzlich des ilvC-Gens.

45 Der Begriff „Verstärkung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme, die durch die entsprechende DNA codiert werden, indem man die Kopienzahl des(der) Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen spezifischen Aktivität codiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

50 Insbesondere wurde gefunden, daß bei Überexpression des panE-Gens zusammen mit den Genen panB, panC und panD die Bildung der Pantothenäure weiter verbessert wird. Zur Erzielung der Überexpression kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene mittels Plasmidvektoren wie z. B. pBR322 (Sutcliffe, COLD SPRING HARBOR SYMPOSIA ON QUANTITATIVE BIOLOGY 1979, 43: 77-90) oder pUC19 (Viera, Gene 1982 19:259-268) erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist die lac-UV5-Mutation des lac-Promotors (Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990). In gleicher Weise wirken Expressionskasset-

ten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Diese Methode ist z. B. bei LaVallie et al. (BIO/TECHNOLOGY 11, 187-193 (1993) und in PCT/US97/13359 angewendet worden.

[0009] Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden. Ein Beispiel hierfür ist die als its bekannte Regulation der Expression des lac-Operons durch Glukose und Laktose. Die Erfinder haben darüberhinaus herausgefunden, daß die Überexpression des panE-Gens sich in Stämmen vorteilhaft auswirkt, die Resistenzmutationen gegen Metabolite und Antimetabolite wie z. B. Resistenz gegen L-Valin aufweisen. Weiterhin wurde gefunden, daß die Überexpression des panE-Gens sich in Stämmen vorteilhaft auswirkt, die Defektmutationen in Genen von Stoffwechselwegen, wie z.B. dem avtA- oder ilvE-Gen besitzen, die Vorstufen der Pantothenäsäure umsetzen oder die Pantothenäsäurebildung mindern.

[0010] Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können Pantothenäsäure aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Dabei handelt es sich um Pilze, Hefen oder insbesondere Grampositive Bakterien z. B. der Gattung *Corynebacterium* oder um Gram-negative Bakterien, wie z. B. die der *Enterobacteriaceae*. Bei der Familie der *Enterobacteriaceae* ist besonders die Gattung *Escherichia* mit der Art *Escherichia coli* zu nennen. Innerhalb der Art *Escherichia coli* sind die sogenannten K-12 Stämme wie z. B. die Stämme MG1655 oder W3110 (Neidhard et al.: *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology* (ASM Press, Washington D.C.)) oder der *Escherichia coli* Wildtypstamm IFO3547 (Institut für Fermentation, Osaka, Japan) und davon abgeleitete Mutanten zu nennen. Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, Aminosäuren zu bilden. Zu dieser Art gehören Wildtypstämme wie z. B. *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, *Brevibacterium flavum* ATCC14067, *Corynebacterium melassecola* ATCC17965 und andere.

[0011] Für die Isolierung des ilvC-Gens und des panE-Gens stellt man sich zunächst eine Mutante beispielsweise von *Escherichia coli* her, die eine Mutation im ilvC-Gen und panE-Gen trägt.

[0012] Die Nukleotidsequenz des ilvC-Gens von *Escherichia coli* ist bekannt (Wek and Hatfield, Journal of Biological Chemistry 261, 2441-2450 (1986)). Methoden zur Isolierung chromosomaler DNS sind ebenfalls bekannt (Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)). Durch Wahl geeigneter Primer kann das ilvC-Gen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert werden (Innis et al., PCR protocols. A guide to methods and applications, 1990, Academic Press). Anschließend wird es in einen Plasmidvektor eingefügt. Als Plasmidvektoren kommen solche in Frage, die in den entsprechenden Mikroorganismen replizieren können. Für *Escherichia coli* kommen z.B. die Vektoren pSC101 (Vocke and Bastia, Proceedings of the National Academy of Science U.S.A. 80 (21), 6557-6561 (1983)) oder pKK223-3 (Brosius and Holz, Proceedings of the National Academy of Science USA 81, 6929 (1984)), für *Corynebacterium glutamicum* z.B. der Vektor pJC1 (Cremer et al., Mol. Gen. Genet. 220:478-480 (1990)) oder pEKE₂ (Eikmanns et al., Gene 102:93-98 (1991)) oder pZ8-1 (Europäische Patentschrift 0 375 889) und für *Saccharomyces cerevisiae* z. B. der Vektor pBB116 (Berse, Gene 25: 109-117 (1983)) oder pDG1 (Buxton et al., Gene 37: 207-214 (1985)) für die vorliegende Erfindung in Frage. Methoden zum Einbau von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren sind bei Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) beschrieben. Methoden zur Transformation und Elektroporation sind bei Tauch et al. (FEMS Microbiology Letters 123:343-347 (1994)) beschrieben. Ein Beispiel eines solchen transformierten Stammes ist der *Escherichia coli* Stamm MG1655/pFE32. Plasmid pFE32 enthält das ilvC-Gen von MG1655 das in den Vektor pBR322 eingebaut wurde. Ein weiteres Beispiel eines solchen transformierten Stammes ist der *Corynebacterium glutamicum* Stamm ATCC13032/pFE91. Plasmid pFE91 enthält das ilvC-Gen von ATCC13032 das in den Vektor pECm3 eingebaut wurde. Das Plasmid pECm3 ist ein Derivat des Plasmids pECm2 (Tauch, 1994, FEMS Microbiological Letters, 123:343-348), dessen Kanamycin-Resistenzgen durch eine BgIII- und BamHI-Restriktion mit anschließender Religation entfernt wurde.

[0013] Zum Einbau einer Mutation in das ilvC-Gen, die dessen Funktion ausschaltet, kann beispielsweise eine Deletion oder Insertion in dieses eingebaut werden. Zur Erzeugung einer Deletion kann mit Hilfe geeigneter Restriktionsenzyme und anschließender Verknüpfung der entstandenen Enden ein innerer Teil der Nukleotidsequenz des Strukturgens entfernt werden. Das auf diese Weise mutierte ilvC-Gen ist funktionslos. In gleicher Weise kann in das ilvC-Gen ein zweites Gen eingebaut werden, daß für eine Resistenz gegen ein Antibiotikum kodiert. Das auf diese Weise mutierte ilvC-Gen ist ebenfalls funktionslos. Das dergestalt mutierte ilvC-Gen kann anschließend in einen Mikroorganismus eingebracht und in dessen Chromosom gegen das Wildtyp-Gen ausgetauscht werden. Methoden, wie dieser Genaustausch durchzuführen ist, sind in der Literatur bekannt. Für *Escherichia coli* kann die von Hamilton et al. (Journal of Bacteriology 171, 4617-4622 (1989)) beschriebene Methode eingesetzt werden, die auf temperatursensitiven Replikationsmutanten des Plasmids pSC101 beruht. Ein derartiges Plasmid ist z. B. pMAK705. Für *Corynebacterium glutamicum* kann die von Schwarzer und Pühler (BIO/TECHNOLOGY 9, 84-87 (1991)) beschriebene Methode des Genaustauschs verwendet werden, bei der nichtreplikative Plasmidvektoren verwendet werden. Für *Saccharomyces cerevisiae* ist eine Methode des gezielten Genaustausches bei Roca et al. (Nucleic Acid Research 20(17), 4671-4672 (1992)) beschrieben.

[0014] Ein mutiertes ilvC-Gen kann beispielsweise folgendermaßen aus einem Wildtyp ilvC-Gen hergestellt wer-

den. Das Plasmid pFE32 besteht aus pBR322 in dessen BamHI-Restriktionsschnittstelle das ilvC-Wildtypgen eingebaut wurde. In die KpnI-Schnittstelle des ilvC-Gens von pFE32 wurde das aacC1-Gen eingebaut, das für Resistenz gegen das Antibiotikum Gentamycin kodiert (Schweizer, BioTechniques 15 (5), 831-834 (1993)). Das auf diese Weise erhaltene Plasmid pFE33 enthält das ilvC::aacC1-Allel, das kein funktionsfähiges ilvC-Genprodukt mehr bilden kann.

5 Das ilvC::aacC1-Allel wurde aus dem Plasmid pFE33 entnommen und in die SphI-Schnittstelle des Plasmids pMAK705 eingefügt, wodurch das Plasmid pDB1 entstand. Plasmid pDB1 ist ein zum Allelaustausch befähigter Plasmidvektor der zum einen aus pMAK705 und zum anderen aus dem ilvC::aacC1-Allel besteht. Plasmid pDB1 wurde nach der von Hamilton et al. beschriebenen Methode verwendet, um das in MG1655 vorhandene Wildtyp ilvC-Gen gegen das ilvC::aacC1-Allel auszutauschen. Der auf diese Weise entstandene Stamm wurde als FE4 bezeichnet.

10 [0015] Für die Isolierung einer Mutante von FE4, die eine Mutation im panE-Gen trägt wurde der Stamm FE4 einer Transposon-Mutagenese mit dem Transposon Tn5 unterzogen. Das Transposon Tn5 ist bei Auerswald (COLD SPRING HARBOR SYMPOSIA ON QUANTITATIVE BIOLOGY 45, 107-113 (1981)) beschrieben. Die Methode der Transposon-Mutagenese ist z. B. im Handbuch von Miller, A: Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992) beschrieben. Die Methode ist weiterhin bei Simon (Gene 80, 161-169 (1998)) und auch im Handbuch von Hagemann: Gentechnologische Arbeitsmethoden (Gustav Fischer Verlag, 1990) und zahlreichen anderen der Öffentlichkeit zugänglichen Publikationen beschrieben. Weiterhin können Mutanten auch nach Mutagenese mit ultraviolettem Licht oder nach Behandlung mit einer Mutations-auslösenden Chemikalie wie z. B. N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin erzeugt werden. Unter den auf diese Weise erhaltenen Mutanten können nach Prüfung der Wuchsstoffbedürfnisse insbesondere des Pantothenäure-Bedürfnisses solche Mutanten isoliert werden, die eine Mutation in einem Gen der Pantothenäure-Biosynthese tragen. Von besonderem Interesse sind solche Pantothenäure bedürftige Mutanten, die nicht Ketopantoat aber Pantoat als Wuchsstoff verwenden können und somit in dem für die Ketopantoat-Reduktase (EC 1.1.1169) kodierendem panE-Gen mutiert sind. Ein Beispiel hierfür ist der auf diese Weise erhaltene Stamm FE5, der neben der ilvC::aacC1-Mutation eine panE::Tn5-Mutation trägt.

15 [0016] Mikroorganismen, die eine Defektmutation im ilvC- und panE-Gen tragen wie beispielsweise der Escherichia coli Stamm FE5, können als Klonierwirte zur Isolierung des ilvC- und des besonders interessierenden panE-Gens oder von Nukleotidsequenzen, die für Proteine mit Ketopantoatreduktase-Aktivität kodieren, verwendet werden.

20 [0017] Hierzu wird von dem interessierenden Mikroorganismus eine Genbank angelegt. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990) oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine bekannte Genbank ist die des E. coli K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495 - 508 (1987)) angelegt wurde. Genbanken verschiedener Mikroorganismen können mittlerweile käuflich erworben werden wie beispielsweise eine Genbank von Saccharomyces pombe Stamm Sp63 der Firma Stratagene (Heidelberg, Deutschland) im Plasmid Lambda FIX II (Elgin, Strategies 4: 6-7(1991)), eine Genbank des Escherichia coli Stammes W1485 der Firma CLONTECH (Heidelberg, Deutschland) im Plasmid pGAD10 (Kitts, CLONTECH (Heidelberg, Deutschland) Vectors On Disc version 1.3, 1994), dessen Nukleotidsequenz unter der GenBank accession number U13188 zugänglich ist. Die auf die oben beschriebene Art und Weise hergestellte Genbank kann dann in den oben beschriebenen Wirt FE5 durch Transformation eingebracht werden. So wurde beispielhaft die pGAD10 - Genbank von W1485 in den Stamm FE5 durch Transformation eingebracht und die erhaltenen Transformanten auf ihre Fähigkeit untersucht auf einem Pantothenäure freiem Nährboden zu wachsen. Die in der Plasmid-DNA der erhaltenen Pantothenäure prototrophen Transformanten enthaltenen Insertionen kann durch Bestimmung der Nukleotidsequenz untersucht werden. Methoden zur Bestimmung von Nukleotidsequenzen können beispielsweise bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Science USA 74:5463-5467 (1977)) nachgelesen werden. Nukleotidsequenzen können Genen mittels Homologieuntersuchungen zugeordnet werden. Eine Möglichkeit für diese Homologiesuche bietet der Vergleich mit Nukleotidsequenzen der EMBL und GenBank Datenbanken, die mittels des BLAST E-mail Service (Altschul, Journal of Molecular Biology 215, 403-410 (1990)) durchgeführt werden können. Ein Beispiel einer solchen Transformante ist der Escherichia coli Stamm FE5/pFEbank16 der das panE-Gen des E. coli Stammes MG1655 trägt.

25 [0018] Das auf die beschriebene Weise isolierte und identifizierte panE-Gen kann anschließend in einem gewünschten Mikroorganismus zur Expression gebracht werden. Hierzu wird es durch Plasmidvektoren amplifiziert. Diese wiederum können mit Signalstrukturen ausgerüstet sein, die für eine effiziente Transkription und Translation sorgen. Eine Übersicht über Expressionsvektoren findet man beispielsweise in dem Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990) oder bei Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Weiterhin können Expressionssignale wie z. B. der tac-Promotor stromaufwärts des panE-Gens in das Chromosom eingebaut werden. Derartige Methoden sind in WO 98/04715 beschrieben. Das zu exprimierende panE-Gen kann aus dem klonierten chromosomal DNA - Fragment entnommen werden oder es kann wiederum mit Hilfe der Polymerase - Kettenreaktion amplifiziert

werden. Die in dem betreffenden Mikroorganismus vorhandene Menge an Ketopantoat-Reduktase kann mit Hilfe des von Shimizu et al. (Journal of Biological Chemistry 263: 12077-12084 (1988)) beschriebenen Methode bestimmt werden. Ein Beispiel eines derartigen Stammes ist der Escherichia coli Stamm MG1655/pFE65. Plasmid pFE65 besteht aus dem Vektor pKK223-3 in dessen EcoRI-Restriktionsschnittstelle das panE-Gen von Escherichia coli MG1655 eingebaut wurde.

5 [0019] Erfindungsgemäß hat es sich als vorteilhaft erwiesen, zusätzlich zu dem für die Ketopantoat-Reduktase kodierenden panE-Gen eines oder mehrere Gene der Pantothenäure-Biosynthese zu verstärken, insbesondere zu überexprimieren. Hierzu gehören die Gene die für die Enzyme Ketopantoat-Hydroxymethyltransferase (EC 4.1.2.12), Aspartat-1-Decarboxylase (EC 4.1.1.11) und Pantothenat-Synthetase (EC 6.3.2.1) kodieren. In Escherichia coli tragen 10 diese Gene die Bezeichnung panB, panD und panC (Miller, A Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992)). Hierzu können diese Gene in verschiedene kompatible Plasmidvektoren eingebaut werden. Beispiele hierfür sind bei Bartolome et al. 15 (Gene 102, 75-78 (1991) beschrieben. Weiterhin kann die Genexpression durch Veränderung der stromaufwärts gelegenen chromosomal Signalstrukturen erhöht werden. Weiterhin können die betreffenden Gene nacheinander angeordnet unter die Kontrolle eines gemeinsamen Promoters gestellt und in einen Plasmidvektor eingebaut und in einen geeigneten Mikroorganismus eingeführt werden. Ein Beispiel hierfür ist der Escherichia coli Stamm MG1655/pFE80. Das Plasmid pFE80 besteht aus dem Plasmid pKK223-3, das die Gene panB, panD, panC und panE in der angegebenen Reihenfolge enthält. Stromaufwärts des panB-Gens ist in pFE80 der tac-Promotor als Expressionssignal enthalten.

20 [0020] Es hat sich weiterhin als vorteilhaft erwiesen, das panE-Gen und die Expressionseinheit bestehend aus den Genen panB, panD, panC und panE in Wirtsstämmen zu überexprimieren, die chromosomal Mutationen enthalten.

[0021] 25 Es können Mutationen einzeln oder gemeinsam verwendet werden, die Resistenzen gegen Stoffwechselprodukte wie z. B. L-Valin oder α -Ketoisovaleriansäure oder gegen Analoga von Stoffwechselprodukten wie z. B. β -Hydroxyasparaginsäure oder O-Methylthreonin bewirken. Derartige Mutanten treten spontan auf oder können nach Mutagenese mit ultraviolettem Licht oder nach Behandlung mit einer Mutations-auslösenden Chemikalie wie z. B. N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin erzeugt werden und anschließend auf Agarplatten, die die entsprechenden Substanz enthalten, selektiert werden. Verfahren zur Mutationsauslösung und Selektion sind allgemein bekannt und können unter anderem bei Miller (A Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992)) oder im Handbuch "Manual of Methods for 30 General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA) nachgelesen werden. Ein Beispiel für eine derartige Mutante ist der Escherichia coli Stamm FE6, die als spontan auftretende, gegen L-Valin resistente Mutante des Stammes MG1655 isoliert wurde.

[0022] 35 Weiterhin können gezielt ungünstige oder störende, chromosomal kodierte Stoffwechselreaktionen ausgeschaltet werden. Hierzu werden in die entsprechenden Gene Insertionen oder Deletionen eingefügt und die auf diese Weise entstandenen mutierten Gene beziehungsweise Allele in das Chromosom des betreffenden Wirtes eingebaut. Es können die Methoden eingesetzt werden, die oben für die Mutation des ilvC-Gens beschrieben worden sind. Ein Beispiel für eine derartige Mutante ist der Escherichia coli Stamm FE7, der eine avtA::aadB-Mutation im Chromosom trägt. Hierbei handelt es sich um den Stamm MG1655 in dessen avtA-Gen das Resistenz gegen Streptomycin vermittelnde aadB-Gen aus Plasmid pHp45 Ω (Prentki und Krisch, Gene 29, 303-313 (1984)) eingesetzt wurde.

40 In den auf diese Weise hergestellten Wirtsstämmen kann dann das panE-Gen allein oder in Kombination mit anderen Genen überexprimiert werden. Beispiele hierfür sind die Stämme FE6/pFE80 und FE7/pFE80.

[0023] 45 Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Pantothenäure-Produktion kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

50 Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Mikroorganismen genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedenster Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten. Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlenhydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z. B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Stickstoffquelle 55 können organische Stickstoff haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat

oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies Vorstufen der Pantothensäure wie β -Alanin oder Ketopantoinsäure und deren Salze zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

[0024] Zur pH - Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak, oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester oder Silikonöle eingesetzt werden.

[0025] Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 50°C und vorzugsweise bei 25°C bis 45°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt bis sich ein Maximum an Pantothensäure gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

[0026] Die Konzentration an gebildeter Pantothensäure kann mit bekannten Verfahren (Velisek; Chromatographic Science 60, 515-560 (1992)) bestimmt werden.

[0027] Folgende Mikroorganismen wurden bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapest Vertrag hinterlegt:

- 20 • Escherichia coli K12 Stamm FE5 als DSM12378
- Escherichia coli K12 Stamm MG1655/pFE32 als DSM12413
- Escherichia coli K12 Stamm MG1655/pFE65 als DSM12382
- 25 • Escherichia coli K12 Stamm MG1655/pFE80 als DSM12414
- Escherichia coli K12 Stamm FE6 als DSM12379
- 30 • Escherichia coli K12 Stamm FE7 als DSM12380

[0028] Mit dem erfundungsgemäßen Verfahren wird dem Fachmann ein neues Werkzeug an die Hand gegeben, um die Pantothensäurebildung von Mikroorganismen gezielt zu verbessern.

35 Beispiele

[0029] Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Beispiel 1

40 Herstellung einer ilvC::aacC1 panE::Tn5 Mutante von Escherichia coli K12 Stamm MG1655

1. Herstellung der ilvC::aacC1 Mutante

45 [0030] Ausgehend von der Nukleotidsequenz für das ilvC-Gen in E. coli K12 MG1655, (EMBL-GenBank: Accession Nr. M87049) wurden PCR-Primer synthetisiert (MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland)). Ein ca. 1500 bp großes DNA-Fragment konnte mit diesen Primern unter der Standard-PCR-Methode von Innis et al. (PCR protocols. A guide to methods and applications, 1990, Academic Press) amplifiziert werden. Die für die PCR eingesetzte chromosomal E. coli K12 MG1655 DNA wurde mittels des NucleoSpin C + T Kits (Macherey-Nagel (Düren, Deutschland), Produktbeschreibung NucleoSpin C + T, Art.-Nr. 740952) isoliert. Die Größe wurde durch gelelektrophoretische Auftrennung (30 Minuten, 10V/cm) in einem 0,8 %igen Agarosegel bestimmt.

[0031] PCR-Primer für das ilvC-Gen aus E. coli:

55 ilvC1 5'-AGAACACAAACATCACGAGG -3'
ilvC2 5'-CTCCAGGAGAAGGCTTGAGT -3'

[0032] Das PCR-Produkt des ilvC-Gens wurde in das Plasmid pCR®2.1 und in den E. coli Stamm TOP10F' trans-

formiert (Invitrogen (Leek, Niederlande), Produktbeschreibung Original TA Cloning® Kit, Cat. no. KNM2030-01).

[0032] Der Klonierungserfolg wurde durch Spaltung der DNA des Plasmids pCR®2.1ilvC mit den Restriktionszymen EagI (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung EagI, Code no. 27-0885-01), EcoRI (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung EcoRI, Code no. 27-0884-03) und KpnI (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung KpnI, Code no. 27-0908-01) nachgewiesen. Dazu wurde die Plasmid DNA mittels des QIAprep Spin Plasmid Kits (QIAGEN (Hilden, Deutschland), Cat. no. 27106) isoliert und nach Spaltung in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt (30 Minuten, 10V/cm).

[0033] Zur Isolation des ilvC-Gens aus dem Plasmid pCR®2.1ilvC wurde die isolierte Plasmid DNA mit den Enzymen HindIII (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung HindIII, Code no. 27-0860-01) und XbaI (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-01) gespalten, der Spaltungsansatz im 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt (30 Minuten, 10V/cm) und das 1,5 kbp ilvC-Fragment mit Hilfe des GLASSMAX™ Kits isoliert (GIBCO BRL (Eggenstein, Deutschland), Produktbeschreibung GLASSMAX™ Spin Cartridges, Cat. no. 15590-052). Das isolierte ilvC-Fragment wurde mit dem ebenfalls HindIII und XbaI gespaltenen Plasmid pMAK705 (Hamilton et al., Journal of Bacteriology 1989, 171: 4617-4622) mittels T4 DNA Ligase (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung T4 DNA Ligase, Code no. 27-0870-03) ligiert und der *E. coli* Stamm DH5αmcr (Grant, Proceedings of the National Academy of Science 1990, 87: 4645-4649) mit dem Ligationsansatz elektroporiert (Tauch, FEMS Microbiology Letters 1994, 123: 343-347). Die Selektion auf Plasmid tragende Zellen erfolgte durch ausplattieren des Elektroporationsansatzes auf LB Agar (Lennox, Virology 1955, 1: 190), welcher mit 25 µg/ml Chloramphenicol (Sigma (Deisenhofen, Deutschland) (Deisenhofen, Deutschland), Code no. C 0378) versetzt war und 24 Stunden Inkubation bei 30°C. Das gesuchte Plasmid konnte nach DNA-Isolation und Kontrollspaltung, bei anschließender Gelelektrophorese im 0,8 %igen Agarosegel (30 Minuten, 10V/cm), mit den Enzymen HindIII, XbaI und KpnI in einem Klon identifiziert werden und wurde mit pFE30 bezeichnet.

[0034] Zur Isolation des ilvC-Gens aus dem Plasmid pFE30 wurde die isolierte Plasmid DNA mit dem Enzym BamHI (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-03) gespalten, der Spaltungsansatz im 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt (30 Minuten, 10V/cm) und das 1,5 kbp ilvC-Fragment mit Hilfe des GLASSMAX™ Kits isoliert. Das isolierte ilvC-Fragment wurde mit dem ebenfalls BamHI gespaltenen Plasmid pBR322 (Sutcliffe, COLD SPRING HARBOR SYMPOSIA ON QUANTITATIVE BIOLOGY 1979, 43: 77-90) mittels T4 DNA Ligase ligiert und der *E. coli* Stamm DH5αmcr mit dem Ligationsansatz elektroporiert. Die Selektion auf Plasmid tragende Zellen erfolgte durch ausplattieren des Elektroporationsansatzes auf LB Agar, welcher mit 100 µg/ml Ampicillin (Sigma (Deisenhofen, Deutschland), Code no. A 9518) versetzt war und 24 Stunden Inkubation bei 37°C. Erhaltene Kolonien wurden parallel auf LB+Ampicillin-Agar und LB+(5µg/ml)Tetracyclin (Sigma (Deisenhofen, Deutschland), Code no. T3383) angeimpft. DNA aus Tetracyclin sensitiven Kolonien wurde mit dem QIAprep Spin Plasmid Kit isoliert und der Erfolg der Klonierung mittels einer BamHI- und KpnI-Spaltung und anschließender Auftrennung im 0,8 %igen Agarosegel (30 Minuten, 10V/cm) verifiziert. Das konstruierte Plasmid wurde pFE32 genannt.

[0035] In die KpnI-Schnittstelle des Plasmids pFE32 wurde ein aacC1-Gen kloniert und das erhaltene Plasmid mit pFE33 bezeichnet. Das aacC1-Gen wurde dazu aus einem Agarosegel (30 Minuten, 10V/cm) isoliert, in welchen ein KpnI-Restriktionsansatz des Plasmids pMS255 (Becker, Gene 1995, 162: 37-39) aufgetrennt wurde. Ligation erfolgte mit T4-DNA-Ligase. Nach Elektroporation des Ligationsansatzes in den Stamm DH5αmcr wurden die Transformanten auf PA-Agar (Sambrook, Molecular cloning, 2nd edn, Cold Spring Harbor, 1989), welcher mit 10 µg/ml Gentamycin (Sigma (Deisenhofen, Deutschland), Code no. G3632) versetzt war, selektioniert. DNA aus Gentamycin resistenten Kolonien wurde mit dem QIAprep Spin Plasmid Kit isoliert und der Erfolg der Klonierung mittels einer BamHI- und KpnI-Spaltung und anschließender Auftrennung im 0,8 %igen Agarosegel (30 Minuten, 10V/cm) verifiziert.

[0036] Das ilvC::aacC1-Fragment wurde aus dem Plasmid pFE33 mittels SphI-(Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung SphI, Code no. 27-0951-01) Restriktion gespalten, im 0,8 %igen Agarosegel (30 Minuten, 10V/cm) aufgetrennt und mit dem GLASSMAX™ Kit isoliert. Das Fragment wurde mit dem SphI gespaltenem Plasmid pMAK705 mittels T4-DNA-Ligase ligiert, der Ligationsansatz in den Stamm DH5αmcr elektroporiert und Transformanten durch Inkubation auf PA+Gentamycin-Agar für 24 Stunden bei 30°C selektioniert. DNA aus Gentamycin resistenten Kolonien wurde mit dem QIAprep Spin Plasmid Kit isoliert und der Erfolg der Klonierung mittels einer SphI- und EcoRI-Spaltung im 0,8 %igen Agarosegel (30 Minuten, 10V/cm) nachgewiesen. Das konstruierte Plasmid wurde mit pDB1 bezeichnet.

[0037] Mit Hilfe des Plasmids pDB1 wurde in dem Stamm *E. coli* K12 MG1655 das chromosomal ilvC-Gen gegen das unterbrochene ilvC::aacC1-Fragment ausgetauscht. Für den Genaustausch wurde eine modifizierte Methode nach Hamilton et al. verwendet. Das Plasmid pDB1 wurde in den *E. coli* K12 MG1655 Stamm elektroporiert, anschließend wurden die Transformanten zur Selektion auf Cointegrate auf LB-Chloramphenicol-Agar bei 42°C für 24 Stunden inkubiert. Die erhaltenen Kolonien wurden zur Vereinzelung wiederum auf dem gleichen Medium ausgestrichen und bei 42°C für 24 Stunden inkubiert. Zur Desintegration des Plasmids wurden Einzelkolonien in 5ml LB-Flüssigmedium bei 42°C für 24 Stunden inkubiert, und anschließend eine Verdünnungsreihe des Flüssigmediums auf LB-Chloramphenicol-Agar ausplattiert. Diese Verdünnungsreihe wurde bei 30°C für 24 Stunden inkubiert. Zur Kurierung vom Plasmid

wurden aus der Verdünnungsreihe erhaltene Einzelkolonien in 3 aufeinanderfolgenden Einzelkolonieausstrichen auf LB-Agar bei 42°C für jeweils 24 Stunden angezogen. Zur Kontrolle des Phänotyps wurden die erhaltenen Einzelkolonien parallel auf Agarplatten mit folgenden Medien angeimpft: Medium E (Vogel, Journal of Biological Chemistry 1956, 218: 97-106) + Glucose (0,4%), MediumE + Glucose (0,4%) (Sigma (Deisenhofen, Deutschland), Code no. G8270)+ 5 50µg/ml Isoleucin (Sigma (Deisenhofen, Deutschland), Code no. 17268), MediumE + Glucose (0,4%) + 50µg Ketoisovalerat (ICN (Eschwege, Deutschland), Code no. 151395), MediumE + Glucose (0,4%) + 50µg/ml Isoleucin+50µg Ketoisovalerat, PA-Medium + Gentamycin und LB-Medium + Chloramphenicol. Diese Medien wurden für 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Unter 150 getesteten Einzelkolonien befand sich eine deren Phänotyp den Austausch des chromosomalen ilvC-Gens durch das ilvC::aacC1-Fragment anzeigen. Dieser Stamm wurde mit FE4 bezeichnet.

10

2. Herstellung der ilvC::aacC1 panE::Tn5 Doppelmutante

[0038] Der Stamm FE4 wurde in 5ml LB-Flüssigmedium + 10mM MgSO₄ + 0,2% Maltose (Sigma (Deisenhofen, Deutschland), Code no. M5885) (LBMgMal) bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von 0,5 angezogen. Die Messung der optischen Dichte erfolgte mit einem Pharmacia (Freiburg, Deutschland) Novaspec II Photometer bei einer Wellenlänge von 660 nm. 2ml der Bakterienlösung wurden 5min bei 3000rpm abzentrifugiert (Beckmann Model J2-21 Centrifuge, Rotor JA-17). Nach Aufnahme des Pellets mit 0,5ml LBMgMal- Flüssigmedium wurde die Suspension mit 30µl λ::Tn5(Simon, Gene 1989, 80(1):161-169)-Lysat, ca. 10⁸ Bakteriophagen, versetzt. Dieses Lysat wurde aus dem Stamm E. coli K12 C600 (Appleyard, Genetics 1954, 39:440-452) isoliert, nach der Methode von Hagemann (Gentechnologische Arbeitsmethoden, Gustav Fischer Verlag, 1990: 14-18). Die Suspension mit dem λ::Tn5-Lysat wurde für 45 Minuten bei 30°C inkubiert. Nach Abzentrifugation bei 3000rpm für 5 Minuten wurde das Pellet in 10ml PA + 10mM Pyrophosphat aufgenommen und für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Bakterienlösung wurde als Verdünnungsreihe auf Medium E-Agar + Glucose (0,4%) + 25µg/ml Kanamycin + 50µg/ml Isoleucin + 50µg/ml Ketoisovalerat + 50µg/ml Pantothenat ausplattiert und bei 37°C für 48 Stunden inkubiert. Einzelkolonien wurden parallel auf MediumE-Agar + 20 Glucose (0,4%) + 25µg/ml Kanamycin + 50µg/ml Isoleucin + 50µg/ml Ketoisovalerat + 50µg/ml Pantothenat und auf Medium E-Agar + Glucose (0,4%) + 25µg/ml Kanamycin + 50µg/ml Isoleucin + 50µg/ml Ketoisovalerat angeimpft und bei 37°C für 48 Stunden inkubiert. Unter 14000 angeimpften Einzelkolonien konnte eine, als FE5 bezeichnete Kolonie, identifiziert werden welche auf Medium E-Agar + Glucose (0,4%) + 25µg/ml Kanamycin + 50µg/ml Isoleucin + 50µg/ml Ketoisovalerat + 50µg/ml Pantothenat wuchs, nicht aber auf Medium E-Agar + Glucose (0,4%) + 25µg/ml Kanamycin + 30 50µg/ml Isoleucin + 50µg/ml Ketoisovalerat.

3. Charakterisierung der Stämme FE4 und FE5

[0039] Zusammen mit den E. coli Stämmen SJ2 (Jakowski, Genetic Stock Center, Yale University), der eine Mutation im panB-Gen trägt, MW6 (Williams, Genetic Stock Center, Yale University), der eine Mutation im panC-Gen trägt, und DV9 (Vallari, Journal of Bacteriology 1985, 164:136-142), der eine Mutation im panD-Gen trägt, sowie einem Wildtyp wurden die Stämme FE4 und FE5 auf unterschiedlich supplementierten Grundmedien (Medien E-Agar + Glucose (0,4%) + 50µg/ml Isoleucin + 50µg/ml Ketoisovalerat; bei SJ2, DV9 und MW6 zusätzlich 50 µg/ml Thiamin) ausgestrichen und bei 37°C für 48 Stunden inkubiert. Als zusätzliche Supplamente wurden Pantothenat (Calcium-Salz), Ketopantoat (Natrium- Salz), β-Alanin (Sigma (Deisenhofen, Deutschland), Code no. A7752) und Pantoat (Kalium-Salz) verwendet. Ketopantoat wurde aus Ketopantolacton durch Behandlung mit äquimolaren Mengen an NaOH bei 60°C und anschließendem Eindampfen hergestellt. Ketopantolacton wurde nach Ojima et al. (Organic Synthesis 63, 18 (1985)) synthetisiert. Pantoat wurde aus Pantoyllacton (Sigma (Deisenhofen, Deutschland), Code no. P2625) nach der Methode von Primerano und Burns (Journal of Bacteriology 1983, 153: 259-269) hergestellt. Das Ergebnis des Wachstumstests (Tabelle 1) zeigte, daß der Stamm FE4 auf allen unterschiedlich supplementierten Grundmedien wuchs. Der Stamm FE5 wuchs nur auf Medien, die entweder mit Pantothenat oder Pantoat supplementiert waren, nicht aber auf Grundmedien die mit Ketopantoat versetzt waren.

50

55

Tabelle 1

Stamm	Supplemente des Grundmediums				
	keine	β -Alanin [50 μ g/ml]	Ketopantoat [50 μ g/ml]	Pantoat [50 μ g/ml]	Pantothenat [50 μ g/ml]
MG1655	+	+	+	+	+
SJ2	-	-	+	+	+
MW6	-	-	-	-	+
DV9	-	+	-	-	+
FE4	+	+	+	+	+
FE5	-	-	-	+	+

+ = Wachstum

- = kein Wachstum

Beispiel 2

30 Isolierung des panE-Gens von Escherichia coli K12 Stamm W1485

[0040] In den Stamm FE5 wurde die E. coli K12 W1485 MATCHMAKER Genomic Library (CLONTECH (Heidelberg, Deutschland), Cat. no. XL4001AB) elektroporiert. Die E. coli K12 MATCHMAKER Genomic Library enthält die chromosomal DNA von E. coli K12 W1485 als durchschnittlich 1,0 kbp große Inserts in dem Plasmid pGAD10, die Größe der einzelnen Inserts variiert dabei von 0,5 - 3,0 kbp (CLONTECH (Heidelberg, Deutschland)). Die Selektion der Transformanten erfolgte durch Ausplattieren auf Medium E-Agar + Glucose (0,4%) + 100 μ g/ml Ampicillin + 50 μ g/ml Isoleucin + 50 μ g/ml Ketoisovalerat. Aus 20 erhaltenen Kolonien wurde mit Hilfe des QIAprep Spin Plasmid Kits die Plasmid DNA isoliert. Durch eine EcoRI-Spaltung der Plasmid DNA und anschließender Auftrennung im 0,8 %igen Agarosegel (30 Minuten, 10V/cm) wurde gezeigt, daß es sich bei den Plasmiden um 20 pGAD10 Vektoren mit unterschiedlich großen Inserts handelte. Die Sequenzierung (IIT Biotech (Bielefeld, Deutschland)) der Inserts ergab, durch Homologievergleiche mit dem BLAST-Programm (Altschul, Journal of Molecular Biology 1990, 215: 403-410), daß die Inserts in 7 Fällen ein vollständiges ilvC-Gen und in 13 Fällen ein offenes Leseraster enthielten, der mit "ähnlich zu Salmonella typhimurium apbA" bezeichnet wurde (EMBL-GenBank: Accession Nr. U82664). Dieser offenes Leseraster wurde mit panE bezeichnet.

45

Beispiel 3

Überexpression des ilvC-Gens von E. coli in E. coli K12 Stamm MG1655

[0041] Zur Überexpression des ilvC Gens wurde das Plasmid pFE32 (siehe Beispiel 1) verwendet. Die Kodierregion des ilvC-Gens steht im Plasmid pFE32 unter der Kontrolle des vom Plasmid pBR322 kodierten tet-Promotors. Das Plasmid pFE32 wurde in den Stamm E. coli K12 MG1655 elektroporiert und Transformanten auf LB Agar, welcher mit 100 μ g/ml Ampicillin versetzt war, nach anschließender Inkubation für 24 Stunden bei 37°C selektiert. Der erhaltene Stamm wurde als MG1655/pFE32 bezeichnet.

55

Beispiel 4

Überexpression des panE-Gens von E. coli in E. coli K12 Stamm MG1655

5 [0042] Ausgehend von der Nukleotidsequenz für das panE-Gen in E. coli K12 MG1655 wurden PCR-Primer synthetisiert (MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland)). Ein ca. 1000 bp großes DNA-Fragment konnte mit diesen Primern unter der Standard-PCR-Methode aus chromosomaler E. coli K12 MG1655 DNA amplifiziert werden. Die für die PCR eingesetzte chromosomal E. coli K12 MG1655 DNA wurde mittels des NucleoSpin C + T Kits isoliert. Die Größe wurde durch gelelektrophoretische Auftrennung (30 Minuten, 10V/cm) in einem 0,8 %igen Agarosegel bestimmt.

10 [0043] PCR-Primer für das panE-Gen aus E. coli:

panE1	5'-AGGAGGGACAATGAAAATTAC	-3'
panE2	5'-TCAGTCTCTTCACTACCAGG	-3'

15 [0044] Das PCR-Produkt des panE-Gens wurde in das Plasmid pCR®2.1 und in den E. coli Stamm TOP10F' transformiert (Invitrogen (Leek, Niederlande), Produktbeschreibung Original TA Cloning® Kit, Cat. no. KNM2030-01). Der Klonierungserfolg wurde durch Spaltung der DNA des Plasmids pCR®2.1panE mit den Restriktionsenzymen EcoRI und HinclI (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung HinclI, Code no. 27-0858-01) nachgewiesen. Dazu wurde die Plasmid DNA mittels des QIAprep Spin Plasmid Kits isoliert und nach Spaltung in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt (30 Minuten, 10V/cm).

20 [0045] Zur Isolation des panE-Gens aus dem Plasmid pCR®2.1panE wurde die isolierte Plasmid DNA mit dem Enzym EcoRI gespalten, der Spaltungsansatz im 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt (30 Minuten, 10V/cm) und das 1,0 kbp panE-Fragment mit Hilfe des GLASSMAX™ Kits isoliert. Das isolierte panE-Fragment wurde mit dem ebenfalls 25 EcoRI gespaltenen Plasmid pKK223-3 mittels T4 DNA Ligase ligiert und der E. coli Stamm DH5αmcr mit dem Ligationsansatz elektroporiert. Die Selektion auf Plasmid tragende Zellen erfolgte durch Ausplattieren des Elektroporations-ansatzes auf LB Agar, welcher mit 100µg/ml Ampicillin versetzt war und anschließender Inkubation für 24 Stunden bei 37°C. Das gesuchte Plasmid konnte nach DNA-Isolation und Kontrollspaltung, bei anschließender Gelelektrophorese im 0,8 %igen Agarosegel (30 Minuten, 10V/cm), mit den Enzymen EcoRI und HinclI in einem Klon identifiziert werden 30 und wurde mit pFE65 bezeichnet.

35 [0046] Die Kodierregion des panE-Gens steht im Plasmid pFE65 unter der Kontrolle des vom Plasmid pKK223-3 kodierten tac-Promotors. Das Plasmid pFE65 wurde in den Stamm E. coli K12 MG1655 elektroporiert und Transfor-manten auf LB Agar, welcher mit 100µg/ml Ampicillin versetzt war, und anschließender Inkubation für 24 Stunden bei 37°C selektiert. Der erhaltene Stamm wurde als E. coli K12 MG1655/pFE65 bezeichnet.

Beispiel 5

Überexpression des panE-Gens von E. coli zusammen mit panB, panC und panD von E. coli in E. coli K12 Stamm MG1655

40 [0047] Ausgehend von der Nukleotidsequenz für das panB-Gen, panC-Gen und panD-Gen in E. coli K12 MG1655 (EMBL-GenBank: Accession Nr. L17086) wurden PCR-Primer synthetisiert (MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland)). Mit den panB Primern konnte ein ca. 800 bp großes DNA-Fragment, mit den panD Primern ein ca. 400 bp großes DNA-Fragment unter der Standard-PCR-Methode aus chromosomaler E. coli K12 MG1655 DNA amplifiziert werden. Mit den 45 panC Primern konnte ein ca. 850 bp großes DNA-Fragment mittels einer modifizierten Standard-PCR-Methode aus chromosomaler E. coli K12 MG1655 DNA amplifiziert werden. Die Tag-Polymerase wurde durch die Pfu-Polymerase ersetzt und die Pufferbedingungen im PCR-Ansatz entsprechend modifiziert (STRATAGENE (Heidelberg, Deutschland), Produktbeschreibung Pfu-Polymerase, Code no. 600135). Die für die PCR eingesetzte chromosomal E. coli K12 MG1655 DNA wurde mittels des NucleoSpin C + T Kits isoliert. Die Größe aller Amplifikate wurde durch gelelek-50 trophoretische Auftrennung (30 Minuten, 10V/cm) in einem 0,8 %igen Agarosegel bestimmt.

50 [0048] PCR-Primer für das panB-Gen aus E. coli:

panB1	5'-AGGATACGTTATGAAACCGA	-3'
55 panB2	5'-ACAACGTGACTCCTTAATGG	-3'

[0049] PCR-Primer für das panC-Gen aus E. coli:

panC1	5'-AGGAGTCACGTTGTGTTAAT	-3'
panC2	5'-AAGTATTACGCCAGCTCGAC	-3'

5 [0050] PCR-Primer für das panD-Gen aus E. coli:

panD1	5'-AGGTAGAAGTTATGATTGCG	-3'
panD2	5'-TAACAATCAAGCAACCTGTA	-3'

10 [0051] Das PCR-Produkt des panB-Gens wurde in das Plasmid pCR®2.1 und in den E. coli Stamm TOP10F' transformiert (Invitrogen (Leek, Niederlande)). Der Klonierungserfolg des panB-PCR-Produktes wurde durch Spaltung der DNA des Plasmids PCR®2.1panB mit den Restriktionsenzymen EcoRI, EcoRV (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung EcoRV, Code no. 27-0934-01) und Pvull (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung Pvull, Code no. 27-0960-01) nachgewiesen. Dazu wurde die Plasmid DNA mittels des QIAprep Spin Plasmid Kits isoliert und nach Spaltung in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt (30 Minuten, 10V/cm). Das PCR-Produkt des panD-Gens wurde in das Plasmid pCR®2.1 und in den E. coli Stamm TOP10F' transformiert (Invitrogen (Leek, Niederlande)). Der Klonierungserfolg des panD-PCR-Produktes wurde durch Spaltung der DNA des Plasmids pCR®2.1panD mit den Restriktionsenzymen EcoRI, EcoRV und HinclI nachgewiesen. Dazu wurde die Plasmid DNA mittels des QIAprep Spin Plasmid Kits isoliert und nach Spaltung in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt (30 Minuten, 10V/cm). Das PCR-Produkt des panC-Gens wurde in das Plasmid pUC19 (Viera, Gene 1982 19:259-268) und in den E. coli Stamm DH5αmcr elektroporiert. Der Klonierungserfolg des panC-PCR-Produktes wurde durch Spaltung der DNA des Plasmids pUC19panC mit den Restriktionsenzymen EcoRI, HindIII und Sall (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung Sall, Code no. 27-0882-01) nachgewiesen. Dazu wurde die Plasmid DNA mittels des QIAprep Spin Plasmid Kits isoliert und nach Spaltung in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt (30 Minuten, 10V/cm). Das konstruierte Plasmid wurde pFE60 genannt.

20 [0052] Zur Isolation des panB-Gens aus dem Plasmid pCR®2.1panB wurde die isolierte Plasmid DNA mit dem Enzym EcoRI gespalten, der Spaltungsansatz im 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt (30 Minuten, 10V/cm) und das 800 bp panB-Fragment mit Hilfe des GLASSMAX™ Kits isoliert. Das isolierte panB-Fragment wurde mit dem ebenfalls 30 EcoRI gespaltenen Plasmid pKK223-3 mittels T4 DNA Ligase ligiert und der E. coli Stamm DH5αmcr mit dem Ligationsansatz elektroporiert. Die Selektion auf Plasmid tragende Zellen erfolgte durch Ausplattieren des Elektroporations- 35 ansatzes auf LB Agar, welcher mit 100µg/ml Ampicillin versetzt war und anschließender Inkubation für 24 Stunden bei 37°C. Das gesuchte Plasmid konnte nach DNA-Isolation und Kontrollspaltung, bei anschließender Gelelektrophorese im 0,8 %igen Agarosegel (30 Minuten, 10V/cm), mit den Restriktionsenzymen EcoRI, EcoRV und Pvull in einem Klon identifiziert werden und wurde mit pFE40 bezeichnet. Die Kodierregion des panB-Gens steht im Plasmid pFE40 unter der Kontrolle des vom Plasmid pKK223-3 kodierten tac-Promotors.

40 [0053] Zur Isolation des panD-Gens aus dem Plasmid pCR®2.1panD wurde die isolierte Plasmid DNA mit dem Enzym EcoRI gespalten, der Spaltungsansatz im 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt (30 Minuten, 10V/cm) und das 400 bp panD-Fragment mit Hilfe des GLASSMAX™ Kits isoliert. Das isolierte panD-Fragment wurde mit dem ebenfalls 45 EcoRI gespaltenen Plasmid pKK223-3 mittels T4 DNA Ligase ligiert und der E. coli Stamm DH5αmcr mit dem Ligationsansatz elektroporiert. Die Selektion auf Plasmid tragende Zellen erfolgte durch Ausplattieren des Elektroporations- ansatzes auf LB Agar, welcher mit 100µg/ml Ampicillin versetzt war und anschließender Inkubation für 24 Stunden bei 37°C. Das gesuchte Plasmid konnte nach DNA-Isolation und Kontrollspaltung, bei anschließender Gelelektrophorese im 0,8 %igen Agarosegel (30 Minuten, 10V/cm), mit den Enzymen EcoRI, EcoRV und HinclI in einem Klon identifiziert werden und wurde mit pFE50 bezeichnet. Die Kodierregion des panD-Gens steht im Plasmid pFE50 unter der Kontrolle des vom Plasmid pKK223-3 kodierten tac-Promotors.

50 [0054] Das panC-Gen wurde mittels einer HindIII-Smal (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung Smal, Code no. 27-0942-01) -Spaltung aus dem Plasmid pFE60 isoliert, dazu wurde der Spaltungsansatz im 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt (30 Minuten, 10V/cm) und das 850 bp panC-Fragment mit Hilfe des GLASS- 55 MAX™ Kits isoliert. Das isolierte panC-Fragment wurde mit dem ebenfalls HindIII und Smal gespaltenen Plasmid pFE50 mittels T4 DNA Ligase ligiert und der E. coli Stamm DH5αmcr mit dem Ligationsansatz elektroporiert. Die Selektion auf Plasmid tragende Zellen erfolgte durch Ausplattieren des Elektroporationsansatzes auf LB Agar, welcher mit 100µg/ml Ampicillin versetzt war und anschließender Inkubation für 24 Stunden bei 37°C. Das gesuchte Plasmid konnte nach DNA-Isolation und Kontrollspaltung, bei anschließender Gelelektrophorese im 0,8 %igen Agarosegel (30 Minuten, 10V/cm), mit den Enzymen EcoRI, EcoRV, Smal, HindIII und HinclI in einem Klon identifiziert werden und wurde mit pFE52 bezeichnet. Die Kodierregion des panD-Gens und des panC-Gens stehen im Plasmid pFE52 unter der Kontrolle des vom Plasmid pKK223-3 kodierten tac-Promotors und bilden ein Operon.

55 [0055] In die auf den tac-Promotor folgende EcoRI-Schnittstelle des Plasmids pFE52 wurde das panB-Gen kloniert

und das erhaltene Plasmid mit pFE70 bezeichnet. Das panB-Gen wurde dazu aus einem Agarosegel (30 Minuten, 10V/cm) isoliert, in welchen ein EcoRI-Restriktionsansatz des Plasmids pFE40 aufgetrennt wurde. Ligation erfolgte mit T4-DNA-Ligase. Nach Elektroporation des Ligationsansatzes in den Stamm SJ2 wurden die Transformanten auf MediumE-Agar, welcher mit 0,4% Glucose, 100µg/ml Thiamin und 100µg/ml Ampicillin versetzt war, selektioniert. DNA aus Ampicillin resistenten Kolonien wurde mit dem QIAprep Spin Plasmid Kit isoliert und der Erfolg der Klonierung mittels einer EcoRI-, EcoRV-, SmaI-, HindIII- und HinclI-Spaltung und anschließender Auf trennung im 0,8 %igen Agarosegel (30 Minuten, 10V/cm) verifiziert. Die Kodierregion des panB-Gens, panD-Gens und des panC-Gens stehen im Plasmid pFE70 unter der Kontrolle des vom Plasmid pKK223-3 kodierten tac-Promotors und bilden ein Operon.

[0056] Das panE-Gen wurde mittels einer HindIII-SphI (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung SphI, Code no. 27-0951-01) -Spaltung aus dem Plasmid pFE65 isoliert, dazu wurde der Spaltungsansatz im 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt (30 Minuten, 10V/cm) und das panE-Fragment mit Hilfe des GLASSMAX™ Kits isoliert. Das isolierte panE-Fragment wurde mit dem ebenfalls HindIII und partiell SphI gespaltenen Plasmid pFE70 mittels T4 DNA Ligase ligiert und der Stamm FE5 mit dem Ligationsansatz elektroporiert. Die Selektion auf Plasmid tragende Zellen erfolgte durch Ausplattieren des Elektroporationsansatzes auf MediumE-Agar + Glucose (0,4%) + 50µg/ml Isoleucin + 50µg/ml Ketoisovalerat, welcher mit 100µg/ml Ampicillin versetzt war und anschließender Inkubation für 48 Stunden bei 37°C. Das gesuchte Plasmid konnte nach DNA-Isolation und Kontrollspaltung, bei anschließender Gel-elektrophorese im 0,8 %igen Agarosegel (30 Minuten, 10V/cm), mit den Enzymen EcoRI, EcoRV, SphI, HindIII und HinclI in einem Klon identifiziert werden und wurde mit pFE80 bezeichnet. Die Kodierregion des panB-Gens, panD-Gens, panC-Gens und des panE-Gens stehen im Plasmid pFE80 unter der Kontrolle des vom Plasmid pKK223-3 kodierten tac-Promotors und bilden ein Operon.

[0057] Das Plasmid pFE80 wurde in den Stamm E. coli K12 MG1655 elektroporiert und Transformanten auf LB Agar, welcher mit 100µg/ml Ampicillin versetzt war, und anschließender Inkubation für 24 Stunden bei 37°C selektioniert. Der erhaltene Stamm wurde als MG1655/pFE80 bezeichnet.

25 Beispiel 6

Überexpression des panE-Gens von E. coli zusammen mit panB, panC und panD von E. coli in einer Valin-resistenten Mutante von E. coli K12 MG1655

[0058] Der E. coli K12 Stamm MG1655 wurde auf MediumE-Agar, welcher mit 0,4% Glucose und 100 µg/ml Valin (Sigma (Deisenhofen, Deutschland), V0258) versetzt war, ausgestrichen. Nach 48 Stunden Inkubation bei 37°C konnte eine Kolonie isoliert werden. Dieser Stamm wurde mit FE6 bezeichnet. Das Plasmid pFE80 wurde in den Stamm FE6 elektroporiert und Transformanten auf LB Agar, welcher mit 100µg/ml Ampicillin versetzt war, und anschließender Inkubation für 24 Stunden bei 37°C selektioniert. Der erhaltene Stamm wurde als FE6/pFE80 bezeichnet.

35 Beispiel 7

Überexpression des panE-Gens von E. coli zusammen mit panB, panC und panD von E. coli in einer avtA::aadB-Mutante von E. coli K12 MG1655

[0059] Ausgehend von der Nukleotidsequenz für das avtA-Gen (EMBL-GenBank: Accession Nr. Y00490) in E. coli K12 MG1655 wurden PCR-Primer synthetisiert (MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland)). Ein ca. 1,6 kbp großes DNA-Fragment konnte mit diesen Primern unter der Standard-PCR-Methode aus chromosomaler E. coli K12 MG1655 DNA amplifiziert werden. Die Größe wurde durch gelelektrophoretische Auf trennung (30 Minuten, 10V/cm) in einem 0,8 %igen Agarosegel bestimmt.

[0060] PCR-Primer für das avtA-Gen aus E. coli:

avtA1	5'-TGCTCTCTCAACGCCGAA	-3'	
50	avtA2	5'-GAAGCCGCCAACCAGGATAA	-3'

[0061] Das PCR-Produkt des avtA-Gens wurde in das Plasmid pCR®2.1 und in den E. coli Stamm TOP10F' transformiert (Invitrogen (Leek, Niederlande)). Der Klonierungserfolg wurde durch Spaltung der DNA des Plasmids pCR®2.1avtA mit den Restriktionsenzymen EcoRI und SmaI nachgewiesen. Dazu wurde die Plasmid DNA mittels des QIAprep Spin Plasmid Kits isoliert und nach Spaltung in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt (30 Minuten, 10V/cm). In die SmaI-Schnittstelle des Plasmids pCR®2.1avtA wurde ein aadB-Gen kloniert und das erhaltene Plasmid mit pFE23 bezeichnet. Das aadB-Gen wurde dazu aus einem Agarosegel (30 Minuten, 10V/cm) isoliert, in welchen ein SmaI-Restriktionsansatz des Plasmids pHP45Ω (EMBL-GenBank: Accession Nr. K02163) aufgetrennt wurde. Liga-

tion erfolgte mit T4-DNA-Ligase. Nach Elektroporation des Ligationsansatzes in den Stamm DH5 α mr wurden die Transformanten auf PA-Agar, welcher mit 20 μ g/ml Streptomycin (Sigma (Deisenhofen, Deutschland), Code no. S6501) versetzt war, selektioniert. DNA aus Streptomycin resistenten Kolonien wurde mit dem QIAprep Spin Plasmid Kit isoliert und der Erfolg der Klonierung mittels einer EcoRI- und SphI-Spaltung und anschließender Auftrennung im 0,8 %igen Agarosegel (30 Minuten, 10V/cm) verifiziert.

5 [0062] Das avtA::aadB-Fragment wurde aus dem Plasmid pFE23 mittels EcoRI-Restriktion gespalten, im 0,8 %igen Agarosegel (30 Minuten, 10V/cm) aufgetrennt und mit dem GLASSMAX™ Kit isoliert. Das Fragment wurde mit dem partiell EcoRI gespaltenem Plasmid pMAK705 mittels T4-DNA-Ligase ligiert, der Ligationsansatz in den Stamm DH5 α mr elektroporiert und Transformanten durch Inkubation auf LB-Agar + 20 μ g/ml Streptomycin + 25 μ g/ml Chloramphenicol für 24 Stunden bei 30°C selektioniert. DNA aus Streptomycin und Chloramphenicol resistenten Kolonien wurde mit dem QIAprep Spin Plasmid Kit isoliert und der Erfolg der Klonierung mittels einer SphI- und EcoRI-Spaltung im 0,8 %igen Agarosegel (30 Minuten, 10V/cm) nachgewiesen. Das konstruierte Plasmid wurde mit pFE24 bezeichnet.

10 [0063] Mit Hilfe des Plasmids pFE24 wurde in dem Stamm E. coli K12 MG1655 das chromosomale avtA-Gen gegen das avtA::aadB-Allel ausgetauscht. Für den Genaustausch wurde eine modifizierte Methode nach Hamilton et al. verwendet. Das Plasmid pFE24 wurde in den E. coli K12 MG1655 Stamm elektroporiert, anschließend wurden die Transformanten zur Selektion auf Cointegrate auf LB-Chloramphenicol-Agar bei 42°C für 24 Stunden inkubiert. Die erhaltenen Kolonien wurden zur Vereinzelung wiederum auf dem gleichen Medium ausgestrichen und bei 42°C für 24 Stunden inkubiert. Zur Desintegration des Plasmids wurden Einzelkolonien in 5ml LB-Flüssigmedium bei 42°C für 24 Stunden inkubiert, und anschließend eine Verdünnungsreihe des Flüssigmediums auf LB-Chloramphenicol-Agar ausplattiert. Diese Verdünnungsreihe wurde bei 30°C für 24 Stunden inkubiert. Zur Kurierung vom Plasmid wurden aus der Verdünnungsreihe erhaltene Einzelkolonien in 3 aufeinanderfolgenden Einzelkolonieausstrichen auf LB-Agar bei 42°C für jeweils 24 Stunden angezogen.

15 Zur Kontrolle des Phänotyps wurden die erhaltenen Einzelkolonien parallel auf Agarplatten mit LB- Medium + 20 μ g/ml Streptomycin und LB-Medium + 25 μ g/ml Chloramphenicol angeimpft. Diese Medien wurden für 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Unter 250 getesteten Einzelkolonien befand sich eine deren Phänotyp den Austausch des chromosomalen avtA-Gens durch das avtA::aadB-Fragment anzeigen. Dieser Stamm wurde mit FE7 bezeichnet.

20 [0064] Das Plasmid pFE80 wurde in den Stamm FE7 elektroporiert und Transformanten auf LB Agar, welcher mit 100 μ g/ml Ampicillin versetzt war, und anschließender Inkubation für 24 Stunden bei 37°C selektioniert. Der erhaltene Stamm wurde als FE7/pFE80 bezeichnet.

30

Beispiel 8

Bestimmung der Ketopantoatreduktase-Aktivität in verschiedenen Stämmen von Escherichia coli K12

35 [0065] Die spezifische Ketopantoatreduktase Aktivität wurde nach der bei Shimizu et al. (Journal of Biological Chemistry 263: 12077-12084 (1988)) beschriebenen Methode bestimmt. Hierzu wurden, mittels eines Hybaid RiboLyser (Heidelberg, Deutschland) und des RiboLyser Kit Blue, Zellextrakte der einzelnen Stämme gewonnen. Die Ketopantoatreduktase Aktivität der Extrakte wurde anhand des NADPH Verbrauchs bei Zugabe von Ketopantoat bestimmt. Für den Stamm E. coli K12 MG1655 wurde eine spezifische Ketopantoatreduktase Aktivität von 6,5 mU/mg, für den Stamm E. coli K12 MG1655/pFE65 eine von 22,0 mU/mg bestimmt. Im Falle von Stamm FE5 war keine Aktivität messbar.

40

Beispiel 9

Bildung von Pantothenat durch verschiedene Stämme von Escherichia coli K12

45

[0066] Die Bildung von Pantothenat durch die Stämme MG1655, MG1655/pFE32, MG1655/pFE65, MG1655/pFE80, FE6/pFE80 und FE7/pFE80 wurde in batch - Kultur geprüft. Als Kulturmedium wurde das von Vogel (Journal of Biological Chemistry 1956, 218: 97-106) beschriebene MediumE mit Glucose (0,4%) als Kohlenstoffquelle verwendet. Die Zusammensetzung des verwendeten Mediums ist in Tabelle 2 dargestellt.

50

Tabelle 2

Verbindung	Konzentration
MnSO ₄ · 7H ₂ O	0,2 g/l
Zitronensäure-Monohydrat	2,0 g/l

Tabelle 2 (fortgesetzt)

Verbindung	Konzentration
K ₂ HPO ₄	10,0 g/l
NaNH ₄ HPO ₄ ·H ₂ O	3,5 g/l

5

[0067] 250 ml Erlenmeyerkolben wurden mit 25 ml des angegebenen Nährmediums gefüllt und der Ansatz beimpft. Nach einer Bebrütungszeit von 48 Stunden bei 37°C wurden die optische Dichte und die Pantothenat-Konzentration bestimmt. Für die Bestimmung der Zelldichte wurde die optischen Dichte mit einem Novaspec II Photometer-Photometer der Firma Pharmacia (Freiburg, Deutschland) bei einer Meßwellenlänge von 580 nm eingesetzt. Der Pantothenat-Gehalt wurde im steril filtriertem Kulturüberstand bestimmt. Die Pantothenatbestimmung (als Calciumsalz) erfolgte mit Hilfe des Stammes *Lactobacillus plantarum* ATCC® 8014 nach Angaben des Handbuchs "DIFCO MANUAL" der Firma DIFCO (Michigan, USA; 10th Edition, 1100-1102 (1984)). Das Ergebnis ist in Tabelle 3 zusammengefasst.

15

Tabelle 3

Stamm	Konzentration [µg/ml]	Zelldichte [oD ₅₈₀]	Produktivität [µg/ml/oD ₅₈₀]
MG1655	0,51	2,8	0,18
MG1655/pFE32	1,7	2,8	0,60
MG1655/pFE65	4,6	2,9	1,6
M61655/pFE80	14,0	2,9	4,8
FE6/pFE80	35,7	3,2	11,2
FE7/pFE80	41,7	3,0	13,9

30

Beispiel 10

Bildung von Pantothenat durch verschiedene Stämme von *Escherichia coli* K12 in Gegenwart von Ketopantoat

[0068] Die Bildung von Pantothenat durch die Stämme MG1655, MG1655/pFE32, MG1655/pFE65 bei zugesetztem Ketopantoat wurde in batch - Kultur geprüft. Hierzu wurde das in Beispiel 8 beschriebene Medium mit 50 µg/ml Ketopantoat supplementiert. Die übrigen Versuchsbedingungen sind wie in Beispiel 8 angegeben. Das Ergebnis ist in Tabelle 4 zusammengefasst.

40

Tabelle 4

Stamm	Konzentration [µg/ml]	Zelldichte [oD ₅₈₀]	Produktivität [µg/ml/oD ₅₈₀]
MG1655	6,2	2,9	2,1
MG1655/pFE32	9,0	2,9	3,1
MG1655/pFE65	12,6	2,9	4,3

50

Isolierung des *ilvC*-Gens von *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032

[0069] Chromosomal DNA aus *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al. (Plasmid, 33:168-179, 1995) beschrieben, isoliert und mit der Restriktionsenzym Sau3A (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung Sau3A, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. DNA-Fragmente in einem Größenbereich von 7-9 kb wurden mit Hilfe des "Nucleotrap Extraction Kit for Nucleic Acids" (Macherey und Nagel, Düren, Deutschland; Cat. No. 740584) isoliert und in die dephosphorylierte BamHI-Schnittstelle des Vektors pUC19 (Viera et al., 1982, Gene,

19:259-268; MBI Fermentas, Litauen) ligiert. Die Ligation wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend in den *E. coli* Stamm DH5aMCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch, 1994, FEMS Microbiological Letters, 123:343-348) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) + 100 mg/ml Ampicillin ausplattiert. Nach Inkubation für 24 h bei 37°C konnte die *C. glutamicum* Genbank durch Reisolierung der Plasmid-DNA nach der "Alkalischen-Lyse-Methode" von Birnboim und Doly (1997, Nucleic Acids Research, 7: 1513-1523) aus den Transformanden gewonnen werden. Mit dieser Genbank wurden kompetente Zellen des *E. coli* Stamms FE5, welcher Mutationen im *panE* und *ilvC* Gen trägt, elektroporiert. Der Elektroporationsansatz wurde im Anschluß an die Regenerationsphase (Tauch et.al., 1994, FEMS Microbiological Letters, 123:343-347) zweimal mit Medium E (Vogel and Bonner, 1956, Journal of Biological Chemistry, 218:97-106) gewaschen. Die Selektion der Transformanten erfolgte durch Ausplattieren auf Medium E-Agar + Glucose (0,4%) + 100 µg/ml Ampicillin + 50 µg/ml Isoleucin + 50 µg/ml Ketoisovalerat. Aus 4 erhaltenen Kolonien wurde mit Hilfe des QIAprep Spin Plasmid Kits die Plasmid DNA isoliert. Durch eine *Xba*I-Spaltung der Plasmid DNA und anschließender Auftrennung im 0,8 %igen Agarosegel (30 Minuten, 10V/cm) wurde gezeigt, daß es sich bei den Plasmiden um pUC19 Vektoren mit ca. 6,5 kbp großen Inserts handelte. Die Sequenzierung der Inserts mit anschließenden Homologievergleichen mit Hilfe des BLAST-Programms (Altschul, Journal of Molecular Biology 1990, 215: 403-410) ergab, daß die Inserts in allen Fällen ein vollständiges *ilvC*-Gen aus *C. glutamicum* enthielten (EMBL-GenBank: Accession Nr. L09232). Eines dieser Plasmide wurde mit pFE90 bezeichnet.

20

Beispiel 12

Expression des *ilvC*-Gens von *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 in *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032

25 [0070] Zur Expression des *ilvC*-Gens aus *C. glutamicum* in *C. glutamicum* ATCC13032, wurde das Plasmid pECm3 verwendet. Das Plasmid pECm3 ist ein Derivat des Plasmids pECm2 (Tauch, 1994, FEMS Microbiological Letters, 123:343-348), dessen Kanamycin-Resistenzgen durch eine *Bgl*II- (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung *Bgl*II, Code no. 27-0946-02) und *Bam*HI-Restriktion mit anschließender Religation entfernt wurde. Die Plasmide pECm2 sowie pECm3 sind in der Lage, sowohl in *E. coli* als auch in *C. glutamicum* zu replizieren. Zur Isolation des *ilvC*-Gens aus dem Plasmid pFE90 (Beispiel 11) wurde die isolierte Plasmid DNA mit dem Enzym *Xba*I (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung *Xba*I, Code no. 27-0948-01) gespalten, der Spaltungsansatz im 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt (30 Minuten, 10V/cm) und das 6,5 kbp *ilvC*-Fragment mit Hilfe des GLASSMAX™ Kits isoliert. Das isolierte *ilvC*-Fragment wurde mit dem ebenfalls *Xba*I gespaltenen Plasmid pECm3 mittels T4 DNA Ligase ligiert und der *E. coli* Stamm FE5 mit dem Ligationsansatz elektroporiert. Die Selektion auf Plasmid tragende Zellen erfolgte durch Ausplattieren des Elektroporationsansatzes auf LB Agar, welcher mit 50 µg/ml Chloramphenicol versetzt war und anschließender Inkubation für 24 Stunden bei 37°C. Das gesuchte Plasmid konnte nach DNA-Isolation und Kontrollspaltung, bei anschließender Gelelektrophorese im 0,8 %igen Agarosegel (30 Minuten, 10V/cm), mit dem Enzym *Xba*I in einem Klon identifiziert werden und wurde mit pFE91 bezeichnet.

30 [0071] Das Plasmid pFE91 wurde in den Stamm *C. glutamicum* ATCC13032 elektroporiert und Transformanten auf LB Agar, welcher mit 7,5 µg/ml Chloramphenicol versetzt war, und anschließender Inkubation für 48 Stunden bei 30°C selektiert. Der erhaltene Stamm wurde als *C. glutamicum* ATCC13032/pFE91 bezeichnet.

35

Beispiel 13

Bildung von Pantothenat durch *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032

40 [0072] Die Bildung von Pantothenat durch den *C. glutamicum* Stamm ATCC13032/pFE91 wurde in Medium CGXII (Keilhauer et al., 1993, Journal of Bacteriology, 175:5595-5603) mit 10 mg/ml Chloramphenicol, im Folgenden als *C. glutamicum*-Testmedium bezeichnet, geprüft. Dieses Medium ist in Tabelle 5 dargestellt. Je 50 ml frisch angesetztes *C. glutamicum*-Testmedium wurden mit einer 16 Stunden alten Kultur (*C. glutamicum*-Testmedium, 30°C, 150 Upm) mit einer o.D.₅₈₀ von 0,1 angeimpft. Nach 48stündiger Inkubation bei 30°C und 150 U/min wurden die Zellen durch 10minütige Zentrifugation bei 5000 x g entfernt, der Überstand wurde sterilfiltriert und die Pantothenat-Konzentration bestimmt. Die Zelldichte wurde wie in Beispiel 9 beschrieben bestimmt.

45 [0073] Die Pantothenatbestimmung (als Calciumsalz) erfolgte mit Hilfe des Stammes *Lactobacillus plantarum* ATCC® 8014 nach Angaben des Handbuchs "DIFCO MANUAL" der Firma DIFCO (Michigan, USA, 10th Edition, 1100-1102 (1984)). Das Ergebnis ist in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 5

Substanz	Menge pro Liter	Bemerkung
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g	
Harnstoff	5 g	
KH ₂ KO ₄	1 g	
K ₂ HPO ₄	1 g	
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0.25 g	
MOPS	42 g	
CaCl ₂	10 mg	
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	10 mg	
MnSO ₄ * H ₂ O	10 mg	
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	1 mg	
CuSO ₄	0.2 mg	
NiCl ₂ * 6 H ₂ O	0.02 mg	
Biotin.	0.5 mg	
Glukose	40 g	separat autoklavieren
Protocatechu-säure	0.03 mg	sterilfiltrieren

Tabelle 6

Stamm	Konzentration [µg/ml]	Zelldichte [oD ₅₈₀]	Produktivität [µg/ml/oD ₅₈₀]
ATCC13032	0,2	20	0,010
ATCC13032/pFE91	0,3	20	0,015

40 Beispiel 14:

Expression des panE-Gens von *Saccharomyces cerevisiae*

45 1. Amplifikation des Leserasters YHR063c:

[0074] Ausgehend von der Nukleotidsequenz des *Saccharomyces cerevisiae* Leserasters YHR063c (Accession Nr. U00061 des National Center for Biotechnology, Bethesda, MD, USA) wurden die nachstehenden PCR-Primer synthetisiert (MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland). Anfang bzw. Ende des Leserasters sind durch einen Punkt (.) gekennzeichnet:

- oJD539 (5' EcoRI-NotI START):
5'- GCG CGA ATT CAG ATC CGC GGC CGC AAA GAG GAG AAA TTA ACT.ATG ACT GCA CCA CAC AGA AG -3'
- oJD540 (3' SpeI-PstI STOP):
5'- CGC GAC TAG TCT GCA G.TC AGT CCT TTC TCC AGT CAC-3'

[0075] Als Template diente genomische DNA des *S. cerevisiae* Stammes JD242, die nach der Methode von C.

5 Guthrie und G.R. Fink (Guide to yeast genetics and molecular biology, Methods in Enzymology, Vol. 194, Academic Press, San Diego, CA, 1991) isoliert wurde. Dieser Stamm ist eine haploide Segregante des diploiden Stammes SC288C (Winston et al., Yeast 11, 53ff. (1995)), dessen Genom sequenziert wurde (Goffeau et al., Science 274, pp. 546, (1996)). Die Tetradenanalyse erfolgte nach der Methode von C. Guthrie und G.R. Fink (Guide to yeast genetics
10 ans molecular biology, Methods in Enzymology, Vol. 194, Academic Press, San Diego, CA, 1991). Der Stamm JD242 ist auxotroph für Leucin (leu2Δ1 Allel) und Uracil (ura3-52 Allel). Ein etwa 1,2 kB großes DNA-Fragment konnte unter Verwendung des „High Fidelity Expand Polymerase,“ Kits der Firma Roche (Mannheim) durch 28 PCR-Zyklen unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen amplifiziert werden. Die Größe wurde durch elektrophoretische Auftrennung in einem 0,8%igen Agarosegel bestimmt.

10

2. Konstruktion von pJD-YHR063c:

15 [0076] Zur Expression des YHR063c Leserasters in *S. cerevisiae* wurde das PCR-Amplifikat in den *E. coli* - *S. cerevisiae* Pendelvektor pJDCEX2 eingebaut (Abbildung 8 und Dohmen et al., 1995, Journal of Biological Chemistry 270, 18099-18109)

20 [0077] Das PCR-Produkt wurde zunächst mit EcoRI und SpeI (AGS, Heidelberg, Deutschland) restriktiert. Anschließend wurde es mit pJDCEX2-DNA, welche mit EcoRI und XbaI (AGS, Heidelberg, Deutschland) behandelt worden war, gemischt und mit T4-DNA Ligase (Roche, Mannheim, Deutschland) ligiert. Der Ligationsansatz wurde in den *E. coli* Stamm XL1-Blue (Bullock et al., 1987, Biotechniques 5, 376) transformiert. Tranformanten wurde durch Selektion auf LB-Agar, welcher 150 µg/ml Ampicillin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) enthielt, erhalten. Die Plasmid-DNA aus den Ampicillin resistenten Klonen wurde durch alkalische Lyse präpariert (Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Die isolierte Plasmid-DNA wurde dann durch Restriktion mit NotI und PstI und anschließender Auftrennung im 0,8%igen Agarosegel untersucht. Das Plasmid mit der gewünschten Struktur erhielt den Namen pJD-YHR063c (Abbildung 9). Die Sequenz des in pJD-YHR063c klonierten PCR-Produktes wurde durch Sequenzierung mit den Oligonukleotiden oJD105 und oJD106 verifiziert.

25

- oJD105 (T-CYC1):
5'- GAAGTCATCGAAATAG-3'
- oJD106 (P-CUP1):
5'- TCGTTTCTGTCTTTTC-3'

30

3. Konstruktion von pKK-YHR063c:

35 [0078] Zur Expression des YHR063c-Leserasters in *E. coli* wurde das Plasmid pKK223-3 (Brosius and Holy, Proceedings of the National Academy of Science USA 81, 6929 (1984)) verwendet. Hierzu wurde das Plasmid pJD-YHR063c zunächst mit EcoRI und PstI (AGS, Heidelberg, Deutschland) restriktiert. Das etwa 1,2 kB große YHR063c-Fragment wurde nach elektrophoretischer Auftrennung in einem 0,8%igen Agarosegel aus diesem ausgeschnitten und die DNA mit dem QiaexII Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Anschließend wurde sie in das Plasmid pKK223-3, welches mit EcoRI und PstI geöffnet worden war, mit T4-DNA Ligase (Roche, Mannheim, Deutschland) ligiert. Der Ligationsansatz wurde in den *E. coli* Stamm XL1-Blue (Stratagene, LaJolla, CA, USA) transformiert. Tranformanten wurde durch Selektion auf LB-Medium, welches 150 µg/ml Ampicillin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) enthielt, erhalten. Die Plasmid-DNA aus den Ampicillin resistenten Klonen wurde durch alkalische Lyse präpariert (Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Der Klonierungserfolg wurde durch Restriktion mit EcoRI und PstI und anschließender Auftrennung im 0,8%igen Agarosegel überprüft. Das Plasmid mit der gewünschten Struktur erhielt den Namen pKK-YHR063c.

40

45

Beispiel 15:

50

Komplementation der *E. coli* Mutante FE5

55

[0079] Zur Analyse der panE-Funktion des YHR063c Leserasters aus *S. cerevisiae* wurde untersucht, ob die Expression dieses Leserasters die Pantothensäure-Bedürftigkeit des *E. coli* Stammes FE5 (Beispiel 1) komplementieren kann. Dieser Stamm ist in den Genloci panE und ilvC mutiert. Hierzu wurde zunächst der Stamm FE5 mit Plasmid pKK-YHR063c transformiert.

60

[0080] Anschließend wurde das Wachstum des Stammes FE5/pKK-YHR063c auf M9-Minimalagar (Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), der mit 50 µg/ml Ketoisovalerat (Kiv) und 50 µg/ml Isoleucin (Ile) supplementiert worden war, in Abhängigkeit von der Zugabe von Pantothenat (50 µg/ml) untersucht. Als negative Kontrolle diente der Stamm FE5/pKK223-3 und als positive Kontrolle der Stamm

FE4/pFE65 (Beispiel 4). Tabelle 7 zeigt das Ergebnis des Versuches: Das in Plasmid pKK-YHR063c enthaltene S. cerevisiae Leseraster YHR063c komplementiert die panE-ilvC Doppelmutation des E. coli Stammes FE5. Das Leseraster YHR063c hat die Funktion eines panE-Gens.

5

Tabelle 7

10

Stamm	M9 + Kiv + Ile mit Pantothenat	M9 + Kiv + Ile ohne Pantothenat
FE5/pFE65	Wachstum	Wachstum
FE5/pKK223-3	Wachstum	kein Wachstum
FE5/pKK-YHR063c	Wachstum	Wachstum

15 Beispiel 16

Bestimmung der Ketopantoatreduktase-Aktivität in verschiedenen Stämmen von *Saccharomyces cerevisiae*

[0081] Der *S. cerevisiae* Stamm JD242 (Siehe Beispiel 14) wurde mit den Plasmiden pJDCEX2 und pJD-YHR063c nach der Methode von Dohmen et al. transformiert (Dohmen et al., Yeast 7, 691(1991)). Die Selektion auf Transformanten erfolgte auf leucinfreiem Minimalmedium mit 1,8% Agar (siehe Tab. 8a,b).

[0082] Als Nährmedium wurde eine Pantothethensäure - freie Variante des im Difco-Manual (Michigan, USA; 10th Edition, 1100-1102 (1984)) beschriebenen Yeast Nitrogen Base-Minimalmediums (YNB) verwendet. Es enthielt zusätzlich Glucose (2%), Uracil (40 µg/ml), CuSO₄ (150 µM) zur Induktion des *P_{CUP1}*-Promotors von pJDCEX2 und pJD-YHR-063c, -Leu Drop-Out Supplement der Firma CLONTECH (Heidelberg, Deutschland, Cat. no. 8605-1) (650 µg/ml) und die Supplemente Ketopantoat (100 µg/ml) und β-Alanin (100 µg/ml). Die Zusammensetzung des verwendeten Mediums ist in Tabelle 8a und b dargestellt.

30

Tabelle 8a

35

40

45

50

55

Verbindung	Menge pro Liter
(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,5 g
NaCl	0,1 g
CaCl ₂	0,1 g
H ₃ BO ₃	500 µg
CuSO ₄	40 µg
KI	100 µg
FeCl ₃ * 6 H ₂ O	200 µg
MnSO ₄ * H ₂ O	400 µg
Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	400 µg
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	200 µg
Biotin	2 µg
Folsäure	2 µg
Inositol	2 mg
Niacin	400 µg
p-Aminobenzoësäure	200 µg
Pyridoxin Hydrochlorid	400 µg

Tabelle 8a (fortgesetzt)

Verbindung	Menge pro Liter
Riboflavin	200 µg
Thiamin Hydrochlorid	400 µg

5

10

Tabelle 8b

Zusätze	Menge pro Liter
Glucose	20 g
Uracil	40 mg
CuSO ₄	24 mg
-Leu DO Supplement	650 mg
Ketopantoat	100 mg
β-Alanin	100 mg

15

20

25

30

35

40

45

50

55

[0083] 250 ml Erlenmeyerkolben wurden mit 50 ml des angegebenen Nährmediums befüllt, der Ansatz mit Hilfe einer Impföse mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte beimpft (siehe Tab. 8a,b) und bei 30°C und 175 U/min 72 Stunden inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden 50 ml des gleichen Nährmedium in einem 250 ml Erlenmeyerkolben so mit der Vorkultur beimpft, das die optischen Dichte (580 nm) 0,5 betrug. Nach einer 24 stündigen Bebrütungszeit bei 30°C und 175 U/min wurden die optische Dichte mit einem Novaspec II Photometer der Firma Pharmacia (Freiburg, Deutschland) bei einer Meßwellenlänge von 580 nm gemessen. Sie betrug für beide Kulturen 4,0. Die spezifische Ketopantoatreduktase Aktivität der *S. cerevisiae* Stämme JD242/pJDCEX2 und JD242/pJD-YHR063c wurde nach der bei Shimizu et al. (Journal of Biological Chemistry 263: 12077-12084 (1988)) beschriebenen Methode bestimmt.

[0084] Hierzu wurden, mittels eines Hybaid RiboLyser (Heidelberg, Deutschland) und des RiboLyser Kit Red, Zellextrakte der einzelnen Stämme gewonnen. Die Ketopantoatreduktase Aktivität der Extrakte wurde anhand des NADPH Verbrauchs bei Zugabe von Ketopantoat bestimmt. Der Proteingehalt wurde nach der Methode von Bradford ermittelt (Bradford, Analytical Biochemistry 72, 248ff.(1976)). Für den Kontrollstamm JD242/pJDCEX2 wurde eine spezifische Ketopantoatreduktase Aktivität von 3 mU/mg Protein und für der Stamm JD242/pJD-YHR063c eine spezifische Aktivität von 386 mU/mg Protein bestimmt.

Beispiel 17

40

Bildung von Pantothenat durch verschiedene Stämme von *Saccharomyces cerevisiae*

[0085] Die Bildung von Pantothenat durch die Stämme *S. cerevisiae* JD242/pJDCEX2 und JD242/pJD-YHR063c wurde in batch - Kultur geprüft.

[0086] 250 ml Erlenmeyerkolben wurden mit 50 ml des in Tab. 8a,b angegebenen Nährmediums befüllt, der Ansatz mit Hilfe einer Impföse mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte beimpft (siehe Tabelle 8a,b) und bei 30°C und 175 U/min 72 Stunden inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden 50 ml des gleichen Nährmedium in einem 250 ml Erlenmeyerkolben so mit der Vorkultur beimpft, das die optischen Dichte (580 nm) 0,5 betrug. Nach einer 24 stündigen Bebrütungszeit bei 30°C und 175 U/min wurden die optische Dichte (580 nm) und die Pantothenat-Konzentration bestimmt.

Für die Bestimmung der Zelldichte wurde die optischen Dichte mit einem Novaspec II Photometer der Firma Pharmacia (Freiburg, Deutschland) bei einer Meßwellenlänge von 580 nm gemessen. Der Pantothenat-Gehalt wurde im steril filtrierten Kulturüberstand bestimmt.

[0087] Die Pantothenatbestimmung (als Calciumsalz) erfolgte mit Hilfe des Stammes *Lactobacillus plantarum* ATCC® 8014 nach Angaben des Handbuchs "DIFCO MANUAL" der Firma DIFCO (Michigan, USA, 10th Edition, 1100-1102 (1984)). Das Ergebnis ist in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9

S. cerevisiae Stamm	Konzentration [µg/ml]	Zelldichte [oD ₅₈₀]	Produktivität [µg/ml/oD ₅₈₀]
JD242/pJDCEX2	0,93	4,0	0,023
JD242/pJD-YHR063c	1,12	4,1	0,027

Abbildungen

Folgende Abbildungen sind beigefügt:

[0088]

- Abbildung 1: Karte des Plasmids pDB1
- Abbildung 2: Karte des Plasmids pGAD10
- Abbildung 3: Karte des Plasmids pFEBank16
- Abbildung 4: Karte des Plasmids pFE32
- Abbildung 5: Karte des Plasmids pFE65
- Abbildung 6: Karte des Plasmids pFE80
- Abbildung 7: Karte des Plasmids pFE91
- Abb.8: Karte des Plasmids pJDCEX2.
- Abb.9: Karte des Plasmids pJD-YHR063c.

[0089] Bei der Angabe der Basenpaarzahlen handelt es sich um ca.-Werte, die im Rahmen der Reproduzierbarkeit erhalten werden.

[0090] Die in den Abbildungen verwendeten Abkürzungen haben folgende Bedeutung:

rrnBT1T2: Transkriptions-Terminator des rrnB-Gens

Ptac: tac Promotor

P AHD1: Promotor des ADH1 Gens aus *Saccharomyces cerevisiae*

T ADH1: Terminator des ADH1 Gens aus *Saccharomyces cerevisiae*

repts: thermosensitiver Replikationsursprung

ilvC: Kodierbereich des ilvC Gens

ilvC': 5'-Bereich des ilvC Gens

ilvC: 3'-Bereich des ilvC Gens

panB: Kodierbereich des panB Gens

panC: Kodierbereich des panC Gens

	panD:	Kodierbereich des panD Gens
	panE:	Kodierbereich des panE Gens
5	Amp:	Resistenzgen für Ampicillin
	tet':	5'-Bereich des tet Gens
10	'tet:	3'-Bereich des tet Gens
	Cm:	Resistenzgen für Chloramphenicol
	Gm:	Resistenzgen für Gentamycin
15	Gal4:	Regulator für Galactose induzierbare Gene aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	bps:	Basenpaare
20	LEU2:	Beta-Isopropylmalat Dehydrogenase-Gen von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	2 μ :	Sequenzen des endogenen 2 μ Plasmides von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	Ap ^R :	Beta-Lactamase-Gen
25	P-CUP1:	Promoter des <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CUP1-Gens (Metallothionein)
	T-CYC1:	Terminator des CYC1-Gens (Cytochrom C) von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
30	ORF:	open reading frame
	SD:	Shine-Dalgarno Sequenz
	EcoRI:	Schnittstelle des Restriktionsenzyms EcoRI
35	EcoRV:	Schnittstelle des Restriktionsenzyms EcoRV
	HincII:	Schnittstelle des Restriktionsenzyms HincII
	HindIII:	Schnittstelle des Restriktionsenzyms HindIII
40	KpnI:	Schnittstelle des Restriktionsenzyms KpnI
	Sall:	Schnittstelle des Restriktionsenzyms Sall
45	SmaI:	Schnittstelle des Restriktionsenzyms SmaI
	SphI:	Schnittstelle des Restriktionsenzyms SphI
	PvuII:	Schnittstelle des Restriktionsenzyms PvuII
50	NotI:	Schnittstelle des Restriktionsenzyms NotI aus <i>Nocardia otitidis-cavarium</i>
	SpeI:	Schnittstelle des Restriktionsenzyms SpeI aus <i>Shpaerotilus spec.</i>
55	XbaI:	Schnittstelle des Restriktionsenzyms XbaI aus <i>Xanthomonas badrii</i>
	PstI:	Schnittstelle des Restriktionsenzyms PstI aus <i>Providencia stuartii</i>

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung und Verbesserung Pantothenäure produzierender Mikroorganismen durch Verstärkung, insbesondere Überexpression für die Ketopantoatreduktase codierender Nucleotidsequenzen, insbesondere des panE-Gens, einzeln oder kombiniert miteinander, und gegebenenfalls zusätzlich des ilvC-Gens.
5
2. Verfahren gemäß Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß man zur Erzielung der Überexpression die Kopienzahl der Gene bzw. Nukleotidsequenzen in den Mikroorganismen durch die Insertion von diese Gene bzw. Nukleotidsequenzen tragenden Plasmidvektoren erhöht.
10
3. Verfahren gemäß Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß man zur Erzielung der Überexpression die sich stromaufwärts des Strukturgens befindende Promoter- und Regulationsregion mutiert.
15
4. Verfahren gemäß Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß man zur Erzielung der Überexpression stromaufwärts des Strukturgens Expressionskassetten einbaut.
20
5. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet,
daß man für die Ketopantoatreduktase codierende Nucleotidsequenzen in Mikroorganismen verstärkt insbesondere überexprimiert, die eine oder mehrere Metabolit- und/oder Antimetabolit-Resistenzmutationen aufweisen.
25
6. Verfahren gemäß den Ansprüchen 2 bis 5,
dadurch gekennzeichnet,
daß man zur Erzielung der Verstärkung oder Überexpression das Kulturmedium und/oder die Fermentationsführung ändert.
30
7. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 6,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Stoffwechselwege in den Mikroorganismen ausschaltet, die die Pantothenat-(Pantothenäure)bildung verringern.
35
8. Verfahren gemäß Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß man das avtA-Gen ausschaltet.
40
9. Verfahren gemäß Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß man das ilvE-Gen ausschaltet.
45
10. Verfahren gemäß Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß man das ilvC-Gen von C. glutamicum in Mikroorganismen, insbesondere der Gattungen Corynebakterien oder E. coli überexprimiert oder verstärkt.
50
11. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß man zusätzlich zu den für die Ketopantoatreduktase codierenden Nucleotidsequenzen eines oder mehrere der Gene des Stoffwechselweges der Pantothenäurebildung verstärkt, insbesondere überexprimiert.
55
12. Verfahren gemäß Anspruch 11,
dadurch gekennzeichnet,
daß man eines oder mehrere der Gene, die für Enzyme Ketopantoat-Hydroxymethyltransferase (EC 4.1.2.12), Aspartat-1-Decarboxylase (EC 4.1.1.11) und Pantothenat-Synthetase (EC 6.3.2.1) kodieren, zusätzlich verstärkt, insbesondere überexprimiert.

13. Verfahren gemäß den Ansprüchen 11 und 12,
dadurch gekennzeichnet,
daß man verschiedene kompatible Plasmidvektoren einsetzt, die die genannten Gene enthalten.
- 5 14. Verfahren gemäß den Ansprüchen 10 und 11,
dadurch gekennzeichnet,
daß man einen mit einem oder mehreren miteinander kompatiblen Plasmidvektor(en) transformierten Stamm ein-
setzt, und der Plasmidvektor eines oder mehrere der genannten Gene einschließlich des panE-Gens trägt, in dem
10 die Gene nacheinander angeordnet und unter die Kontrolle eines gemeinsamen Promotors oder getrennt vonein-
ander angeordnet unter die Kontrolle verschiedener Promotoren gestellt werden.
15. Plasmidvektor pFE80,
gekennzeichnet durch
die in Abbildung 6 wiedergebende Restriktionskarte und hinterlegt in E.coli K12 Stamm MG 1655/pFE80 unter der
Bezeichnung DSM 12414.
- 20 16. Plasmidvektor pFE65,
gekennzeichnet durch
die in Abbildung 5 wiedergegebene Restriktionskarte und hinterlegt in E.coli K12 Stamm MG1655/pFE65 unter der
Bezeichnung DSM 12382.
- 25 17. Plasmidvektor pFE32,
gekennzeichnet durch
die in Abbildung 4 wiedergegebene Restriktionskarte und hinterlegt in E.coli K12 Stamm MG1655/pFE32 der
Bezeichnung DSM 12413.
18. E.coli K12 Stamm FE6, der eine Valin-Resistenz trägt.
- 30 19. E.coli K12 Stamm FE7, in dem das avtA-Gen gegen ein avtA::aadB-Fragment ausgetauscht ist, hinterlegt unter der
Bezeichnung DSM 12380.
- 35 20. Ein Mikroorganismus (Wirtszelle) der Gattung E.coli oder Corynebacterium, das eines der Plasmidvektoren gemäß
den Ansprüchen 11 bis 14 und gegebenenfalls eine oder mehrere Metabolit und/oder Antimetabolit-Resistenz ent-
hält.
21. C(glutamicum ATCC 13032/pFE91, das den Plasmidvektor pFE91 mit dem ilvC-Gen von C(glutamicum enthält.
- 40 22. Verfahren zur Herstellung von Pantothenäsäure,
dadurch gekennzeichnet,
daß man folgende Schritte durchführt:
 - a) Fermentation von Mikroorganismen gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüchen,
 - b) Anreicherung der Pantothenäsäure im Medium oder in den Zellen der Mikroorganismen,
 - c) Isolieren der Pantothenäsäure.
- 45 23. Verfahren gemäß Anspruch 22,
dadurch gekennzeichnet,
daß man als Vorstufe Ketopantoat zusetzt.
- 50 24. Verfahren gemäß Anspruch 23,
dadurch charakterisiert,
daß man in Stufe a) eine Vorstufe der Pantothenäsäure zusetzt, ausgewählt aus der Gruppe β -Alanin oder Ketoiso-
valerat.
- 55 25. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß man Mikroorganismen der Gattung E.coli oder Corynebacterium oder Hefe einsetzt.

Abb. 1

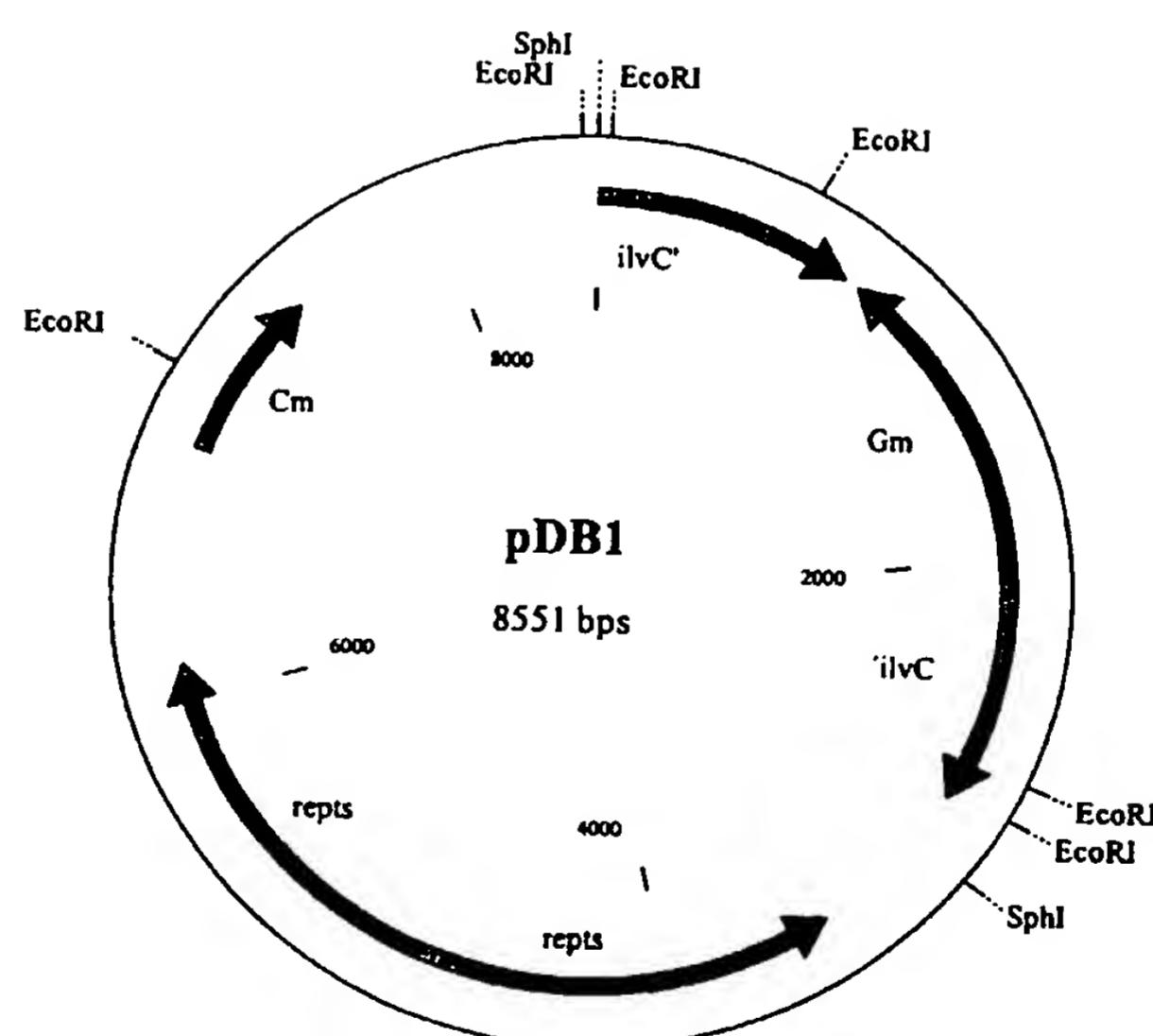


Abb. 2

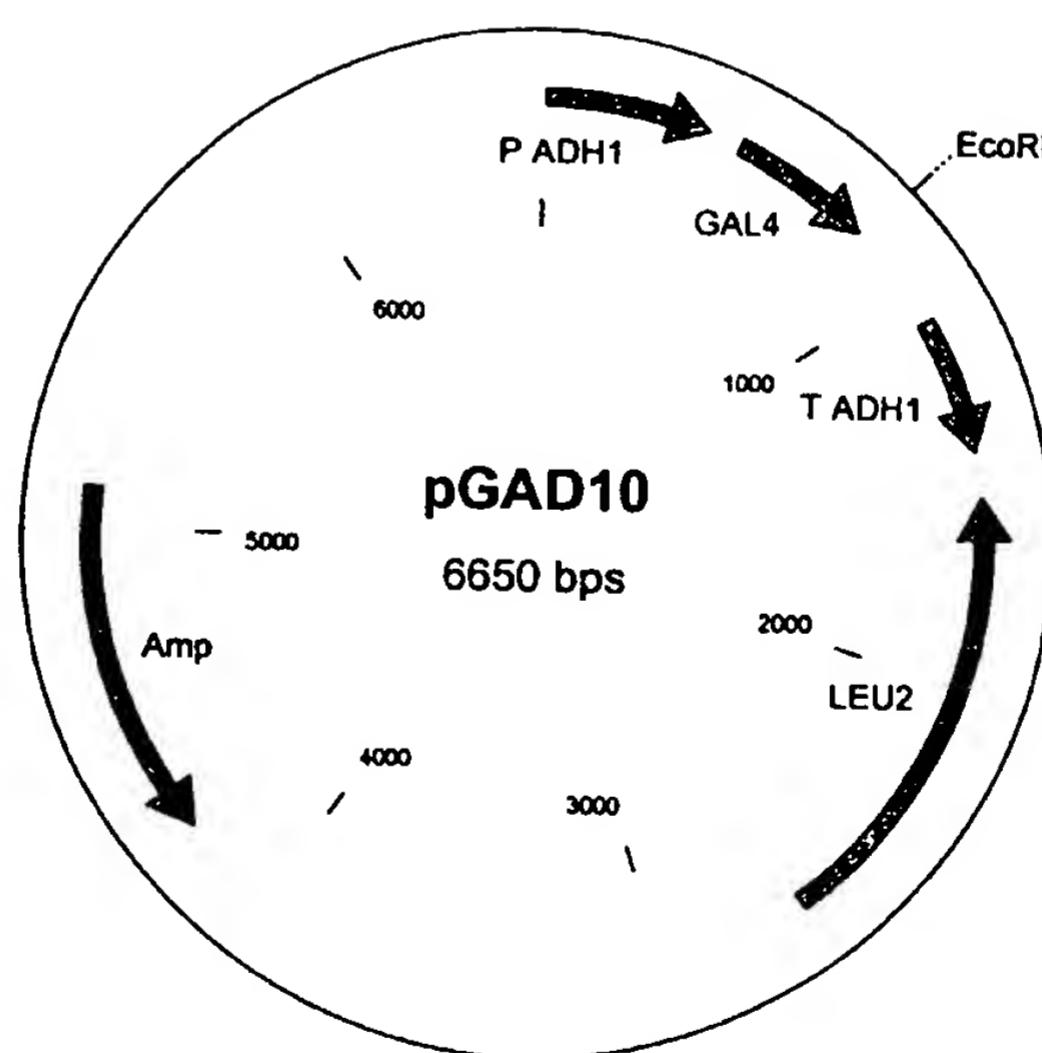


Abb. 3

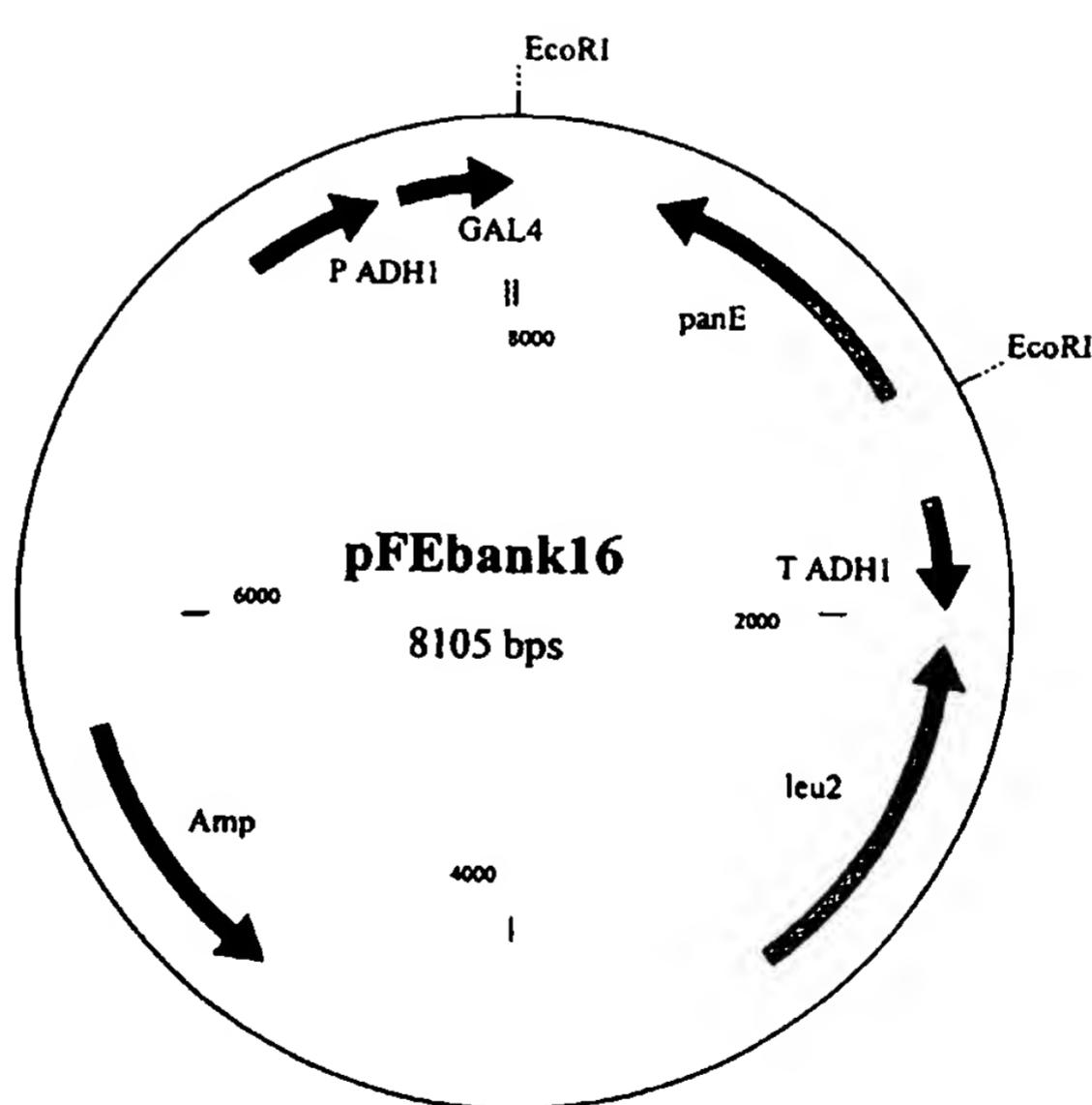


Abb. 4

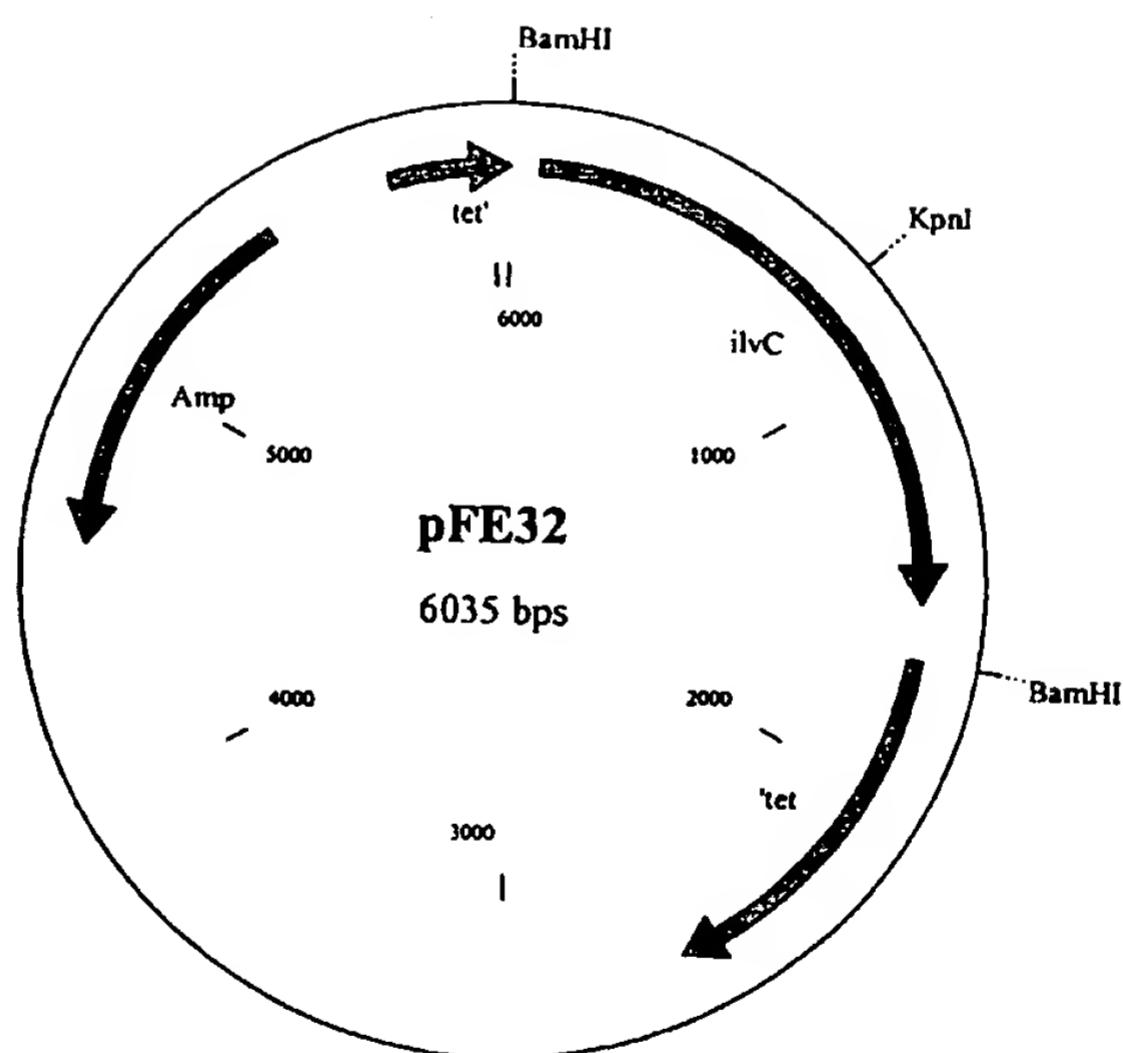


Abb. 5

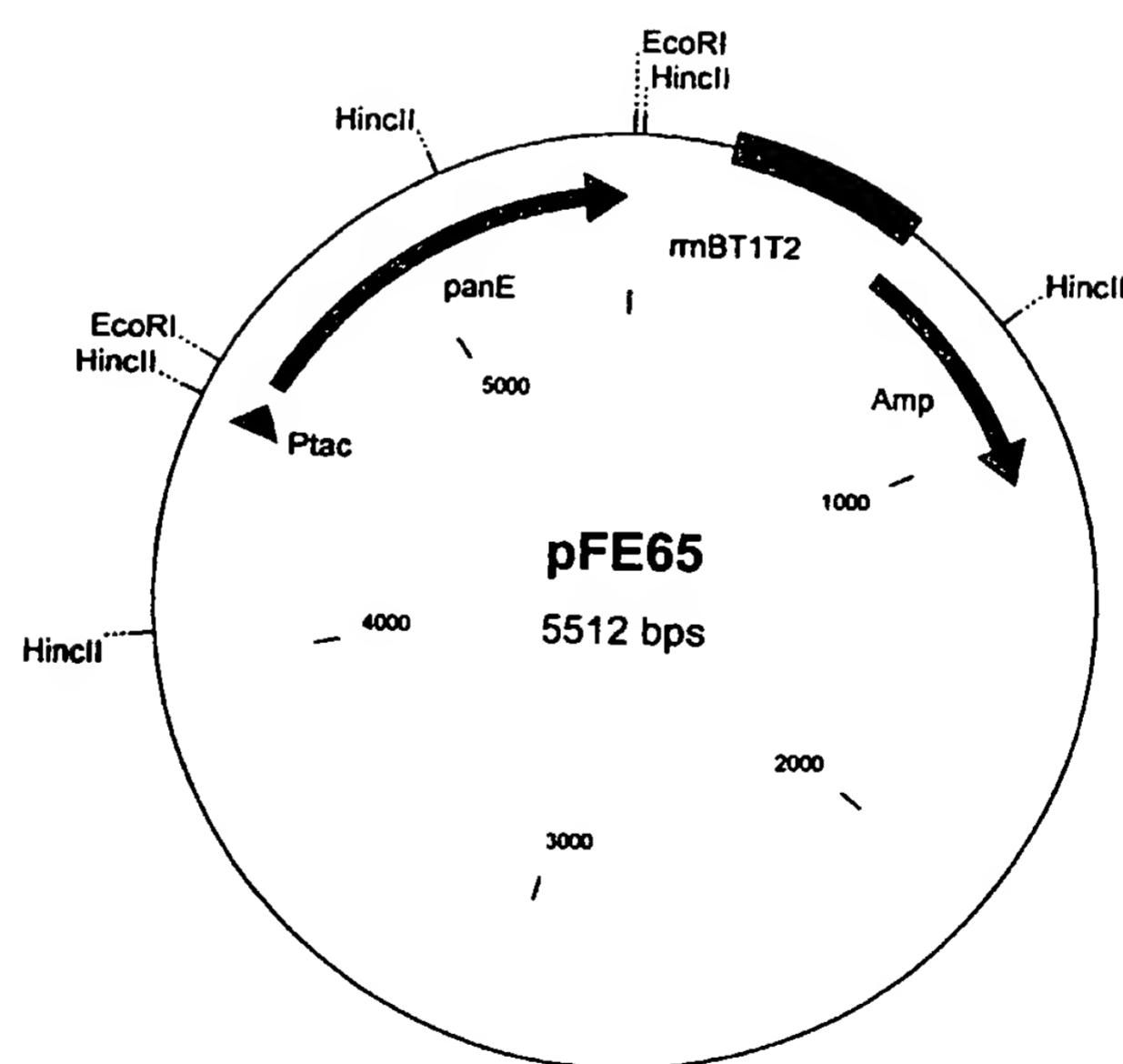


Abb. 6

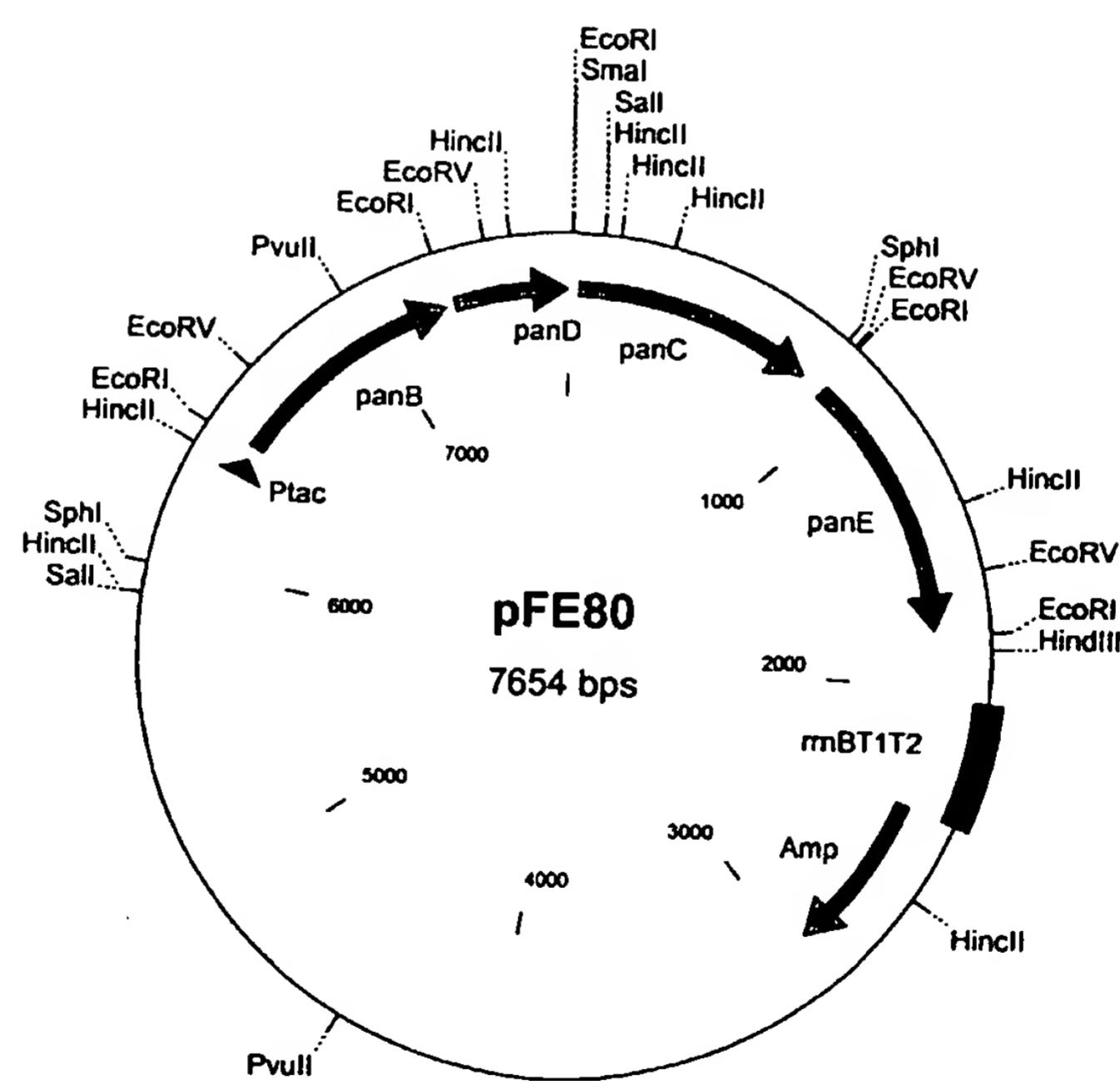
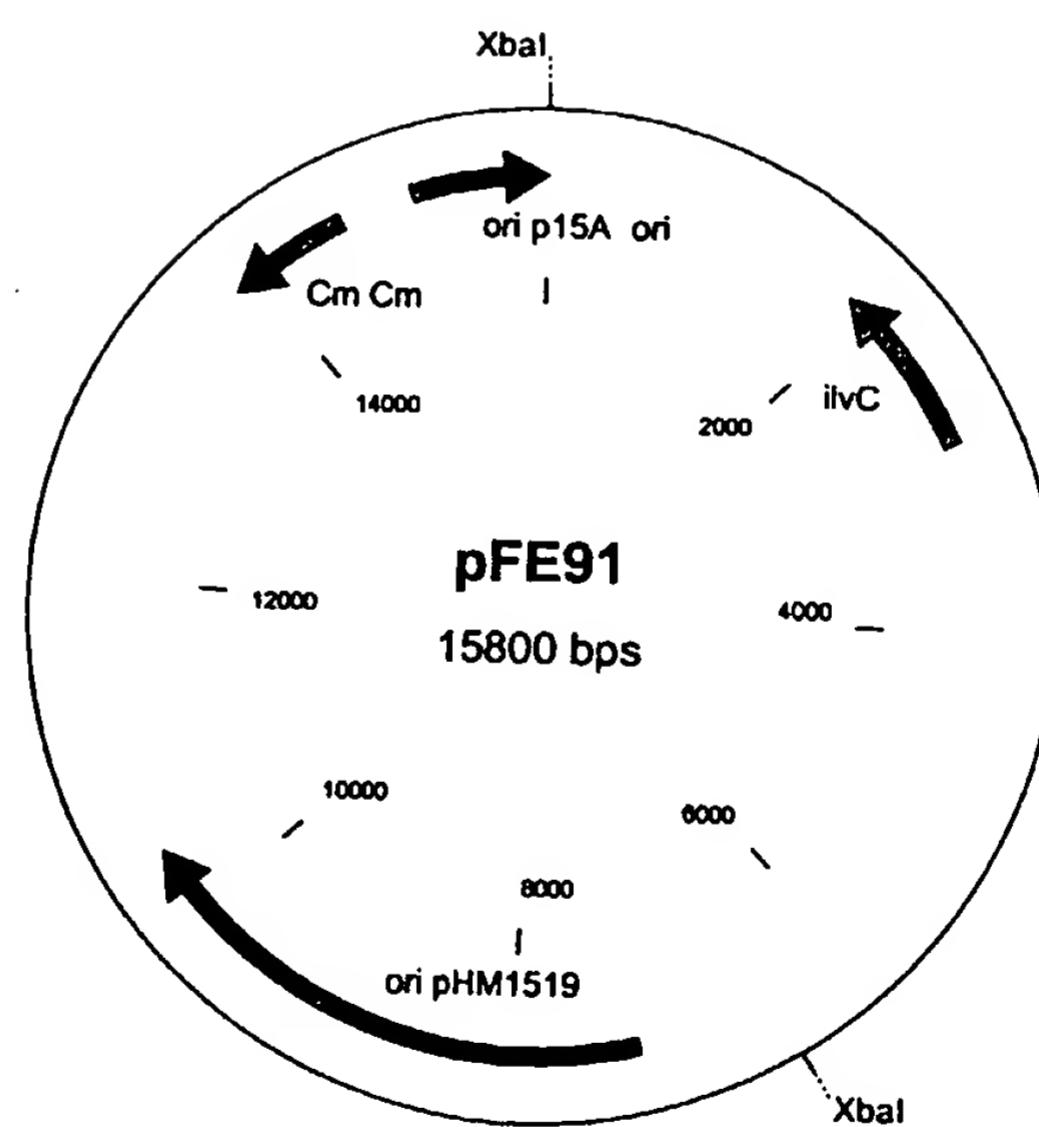
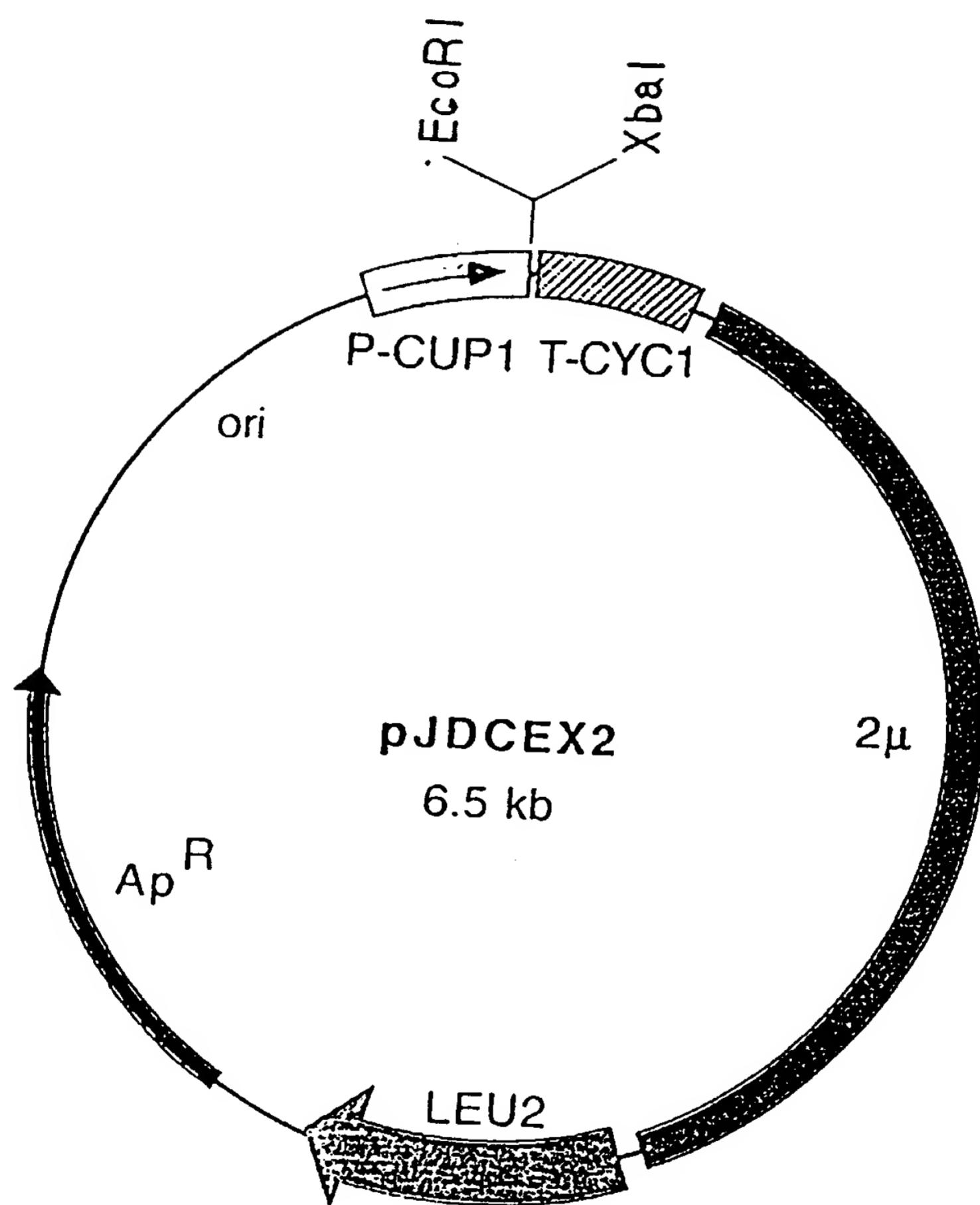
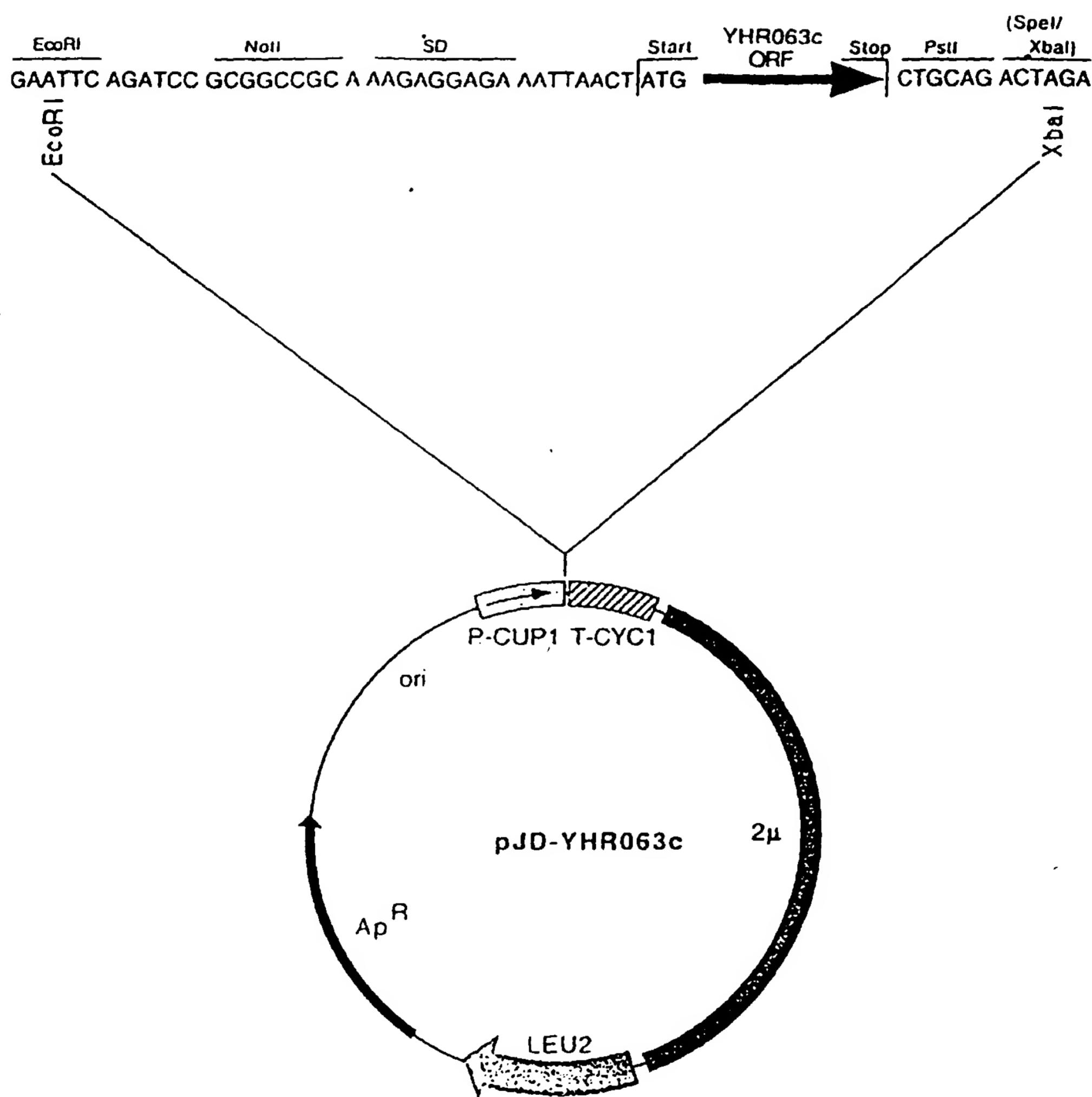


Abb. 7









(19)

Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) EP 1 001 027 A3

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(88) Veröffentlichungstag A3:
16.08.2001 Patentblatt 2001/33

(51) Int Cl.7: C12N 15/53, C12N 15/67,
C12N 15/70, C12N 1/21,
C12P 13/02, C12P 7/42

(43) Veröffentlichungstag A2:
17.05.2000 Patentblatt 2000/20

(21) Anmeldenummer: 99118670.1

(22) Anmeldetag: 22.09.1999

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE

Benannte Erstreckungsstaaten:

AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: 09.10.1998 DE 19846499

(71) Anmelder: Degussa AG
40474 Düsseldorf (DE)

(72) Erfinder:

• Elischewski, Frank, Dr.
33818 Leopoldshöhe (DE)

- Kalinowski, Jörn, Dr.
33615 Bielefeld (DE)
- Pühler, Alfred, Prof. Dr.
33739 Bielefeld (DE)
- Dusch, Nikole, Dr.
33619 Bielefeld (DE)
- Dohmen, Jürgen, Dr.
40760 Meerbusch (DE)
- Farwick, Mike, Dr.
33615 Bielefeld (DE)
- Thierbach, Georg, Dr.
33613 Bielefeld (DE)

(54) **Verfahren zur Herstellung von Pantothenäure durch Verstärkung von für Ketopantoat-Reduktase kodierende Nukleotidsequenzen**

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung und Verbesserung D-Pantothenäure produzierender Mikroorganismen durch Verstärken für die Ketopantoatreduktase codierender Nukleotidsequenzen, insbesondere des panE-Gens, einzeln oder kombiniert miteinander, und gegebenenfalls zusätzlich des ilvC-Gens,

die diese Nukleotidsequenzen enthaltende Mikroorganismen und ein Verfahren zur Herstellung D-Pantothenäure bestehend aus der Fermentation dieser Mikroorganismen, der Anreicherung der Pantothenäure im Medium oder in den Zellen der Mikroorganismen und dem Isolieren der D-Pantothenäure.



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 99 11 8670

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE															
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betritt Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)												
X	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1983 PRIMERANO D A ET AL: "ROLE OF ACETO HYDROXY ACID ISOMERO REDUCTASE IN BIOSYNTHESIS OF PANTOTHENIC-ACID IN SALMONELLA-TYPHIMURIUM" Database accession no. PREV198376072046 XP002170048 * Zusammenfassung * & JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Bd. 153, Nr. 1, 1983, Seiten 259-269, ISSN: 0021-9193</p> <p>---</p>	1-25	<p>C12N15/53 C12N15/67 C12N15/70 C12N1/21 C12P13/02 C12P7/42</p>												
A	<p>DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; BAIGORI, MARIO ET AL: "Isolation and characterization of <i>Bacillus subtilis</i> mutants blocked in the synthesis of pantothenic acid" retrieved from STN Database accession no. 115:86365 XP002170049 * Zusammenfassung * & J. BACTERIOL. (1991), 173(13), 4240-2 ,</p> <p>---</p> <p>----</p> <p>-/-</p>	1-25	<p>RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.7)</p> <p>C12N C12P</p>												
<p>Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt</p> <table border="1"> <tr> <td>Recherchenort</td> <td>Abschlußdatum der Recherche</td> <td>Prüfer</td> </tr> <tr> <td>MÜNCHEN</td> <td>19. Juni 2001</td> <td>Douschan, K</td> </tr> <tr> <td colspan="2">KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE</td> <td>T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am späteren nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument S : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</td> </tr> <tr> <td colspan="2"> X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : rechtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur </td> <td></td> </tr> </table>				Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer	MÜNCHEN	19. Juni 2001	Douschan, K	KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am späteren nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument S : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : rechtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		
Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer													
MÜNCHEN	19. Juni 2001	Douschan, K													
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am späteren nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument S : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument													
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : rechtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur															



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 99 11 8670

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrift Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)
A	<p>DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; SHIMIZU, SAKAYU ET AL: "Ketopantoic acid reductase of <i>Pseudomonas maltophilia</i> 845. Purification, characterization, and role in pantothenate biosynthesis" retrieved from STN Database accession no. 109:186033 XP002170050 * Zusammenfassung * & J. BIOL. CHEM. (1988), 263(24), 12077-84</p> <p>,</p> <p>-----</p>	1-25	<p>RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.7)</p>
<p>Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt</p>			
Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche		Prüfer
MÜNCHEN	19. Juni 2001		Douschan, K
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE		<p>T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>	
<p>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur</p>			